

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SÉRVIO TÚLIO STINGHEN

POLIMORFISMOS DO GENE *VS/G4* EM PACIENTES COM
HANSENÍASE E COINFECÇÃO COM HEPATITE B DE
CURITIBA-PR E SINOP-MT

CURITIBA
2015

SÉRVIO TÚLIO STINGHEN

POLIMORFISMOS DO GENE *VSIG4* EM PACIENTES COM
HANSENÍASE E COINFECÇÃO COM HEPATITE B DE
CURITIBA-PR E SINOP-MT

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção de grau de Doutor em Ciências
Farmacêuticas, no Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da
Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Iara José de Messias-Reason
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Angelica Beate Winter Boldt

CURITIBA
2015

Stinghen, Sérgio Túlio
polimorfismos do gene *VSIG4* em pacientes com hanseníase e coinfeção com hepatite B
de Curitiba-PR e SINOP-MT / Sérgio Túlio Stinghen – Curitiba, 2015.
111 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientadora: Professora Dra. Iara José de Messias-Reason
Coorientadora: Professora Dra. Angelica Beate Winter Boldt
Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de
Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2015.

Inclui bibliografia

1. Hanseníase. 2. Receptor de complemento. 3. *VSIG4*. 4. CRlg. 5. Hepatite B. I. Messias-Reason, Iara José de. II. Boldt, Angelica Beate Winter. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 616.998

TERMO DE APROVAÇÃO

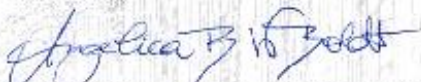
SÉRVIO TÚLIO STINGHEN

Título: "POLIMORFISMOS DO GENE *VSIG4* EM PACIENTES COM HANSENÍASE E COINFECÇÃO COM HEPATITE B DE CURITIBA-PR E SINOP-MT"

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.



Profª. Drª. Iara José de Messias Reasch
Orientadora



Profª. Drª. Angelica Beate Winter Boldt
Co-orientadora



Profª. Drª. Danielle Malheiros Ferreira
Universidade Federal do Paraná



Profª. Drª. Marcia Regina Pincerati
Universidade Positivo



Profª. Drª. Fabiana Antunes de Andrade
Universidade Federal do Paraná



Profª. Drª. Renata Helena Monteiro Sindeaux
Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Curitiba, 28 de maio de 2015.

Dedico esse trabalho aos meus queridos pais, Ayrton e Delormê (*in memoriam*), pelo amor, carinho e ensinamentos, a minha esposa Patricia, pelo amor, apoio e compreensão, e ao meu filho João Vitor que enche de alegria meus dias.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Iara Messias-Reason, minha orientadora, pela oportunidade, incentivo, paciência e orientação.

A minha coorientadora, Prof^a. Dr^a. Angelica Boldt, pela disposição e paciência em me ensinar e orientar.

A todos os pacientes e indivíduos controles que aceitaram fazer parte dessa pesquisa.

A todos da equipe do LIPM que contribuíram para a realização desse estudo. A Sandra, Dr^a. Márcia, Elenice, Dr^a. Fabiana, Leticia, Dr^a. Thaisa, Kárita, Dr^a. Isabela meus agradecimentos pela contribuição fundamental para o trabalho. Ao Marco pelas conversas descontraídas e sempre pronto para ajudar.

Ao Prof. Dr. Renato Nisihara pelo incentivo e apoio em realizar este estudo. A Prof^a Dr^a Shirley pelo apoio e incentivo.

A equipe do Hemepar, em nome do Paulo Hatschbach e da Elisângela, ao Serviço de Dermatologia do HC – UFPR, em nome do Dr. Jesus Santamaria, ao Centro Regional de Especialidades Metropolitano - CRE METROPOLITANO, em nome da Dr^a. Ewalda Stahlke e Andressa Lima, a equipe do Centro de Referência em Hanseníase e Tuberculose de Sinop-MT, em nome do Pedro Siqueira e Dr^a. Jussara Wolhmuth.

A minha amiga Marilde pelo grande apoio e pelas coletas no município de Sinop. A Ivete pelo levantamento dos dados dos pacientes de Sinop.

RESUMO

A hanseníase é um problema de saúde pública no Brasil. O *M. leprae*, agente causador da doença, é um bacilo intracelular obrigatório de macrófagos e células de Schwann. O CRIg é um receptor de complemento mediador da fagocitose que é expresso em macrófagos e codificado pelo gene *VSIG4* (*V-set and Ig domain-containing protein 4*), localizado em Xq12. Postula-se que o CRIg, possa exercer um papel na fagocitose do bacilo, similarmente ao observado com outros receptores de complemento. Além disso, pacientes com hanseníase parecem ser mais suscetíveis a coinfeção pelo HBV. Neste trabalho, investigamos uma possível associação entre a suscetibilidade à hanseníase e à coinfeção hanseníase – hepatite B e haplótipos formados por seis polimorfismos de *VSIG4*, os quais podem modular a expressão gênica e regulação do processamento do pré-mRNA: -1431 e -685 na região promotora; +6069 no intron 01; +6432 no exon 02 – responsável pela substituição de aminoácido R108W; +10234 e +10899 no intron 03. Foram genotipados através da PCR sequência específica, 191 pacientes com hanseníase da Região Sul (Curitiba-PR), pareados com 177 controles. Os três haplótipos mais frequentes *2B2 (TGACTA), *1 (TCGCCG) e *2B (TGGCCG) foram associados com hanseníase, especificamente os polimorfismos localizados nos introns 1 e 3: ATA, associado com proteção (OR=0,52 [IC95%=0,28-0,96], P=0,038), e GCG, com uma tendência a suscetibilidade à hanseníase *per se* (OR=2,52 [IC95%=0,95-6,62], P=0,061), independentemente do efeito protetor de outro gene, *FCN2**AGA. Os haplótipos *2B2 (TGACTA) (OR=0,4 [IC95%=0,2-0,81], P=0,011) e *2B (TGGCCG) e/ou *1 (TCGCCG) (OR=14,2 [IC95%=3,70-54,41], P<0,001), foram associados com proteção e suscetibilidade à coinfeção hanseníase e HBV, respectivamente. As mesmas associações com hanseníase em Curitiba foram identificadas em pacientes (N=170) e controles (N=121) de Sinop-MT, apesar de diferenças genéticas entre as populações. Em Sinop, o haplótipo ATA, nos introns 1 e 3, foi associado com proteção à hanseníase *per se* (OR=0,47 [IC95% =0,26-0,85], P=0,012), e GCG, com uma tendência de associação a suscetibilidade (OR=1,6 [IC95%=0,98-2,61], P=0,060). Por meio da análise *in silico*, há indícios que as substituições T>C e A>G no intron 3 destruam um sítio de silenciamento de processamento do exon 3, causando a sua remoção e ausência do domínio IgC2 da proteína CRIg madura, isoforma VSIG4-003. Concluindo, os resultados levam-nos a sugerir que o gene *VSIG4* influencia a suscetibilidade à hanseníase e coinfeção com hepatite B. Estudos complementares dos polimorfismos deste gene e seus produtos gênicos são necessários para validar o papel do gene *VSIG4* e da proteína CRIg na infecção pelo *M. leprae* e coinfeção com o vírus da hepatite B.

Palavras – chave: Hanseníase; receptor de complemento; *VSIG4*; CRIg; hepatite B.

ABSTRACT

Leprosy is a public health problem in Brazil. The etiologic agent, *M. leprae*, is an obligate intracellular pathogen of macrophage and Schwann cells. CRIg, encoded by the *VSIG4* gene (V-set and Ig domain-containing protein 4) on Xq12, is a complement receptor that mediates phagocytosis. CRIg is expressed in macrophages, target cells of *M. leprae* which suggests a role, similarly as observed for other complement receptors, in the bacillus phagocytosis. Moreover patients with leprosy seem to be more susceptible to HBV co-infection. In this work, we investigated possible associations between leprosy and the co-infection leprosy/hepatitis B and polymorphism of *VSIG4* gene. Haplotypes formed by pre-mRNA processing regulators -1431 and -685 at the promoting region, +6432 responsible for amino acid substitution R108W in exon 02 – and +10234 and +10899 at intron 03 were evaluated. Using PCR-SSP, were genotyped 191 leprosy patients paired with 177 controls from Curitiba, Southern Brazil. The three most common haplotypes *2B2 (TGACTA), *1 (TCGCCG) and *2B (TGGCCG) were associated with leprosy, specifically polymorphisms at intron 1 and 3, ATA were associated with protection to leprosy *per se* (OR=0,52 [IC95%=0,28-0,96], P=0,038), and GCG, showed a tendency of association with susceptibility (OR=2,52 [IC95%=0,95-6,62], P=0,061), regardless the *FCN2**AGA protector effect. *VSIG4* haplotypes encompassing promoter, intron 1, exon 2 and intron 3 variations *2B2 (TGACTA) (OR=0,4 [IC95%=0,2-0,81], P=0,011) and *2B (TGGCCG)/*1 (TCGCCG) (OR=14,2 [IC95%=3,70-54,41], P<0,001), were related to protection and susceptibility to leprosy and HBV co-infection, respectively. Associations related to leprosy in Curitiba were also seen in leprosy patients (n=170) and controls (121) from Sinop, Central-East Brazil, In Sinop, the *VSIG4* haplotype ATA at intron 1 and 3 was associated with protection to leprosy *per se* (OR=0,47 [IC95% =0,26-0,85], P=0,012) and GCG showed a tendency to susceptibility (OR=1,6 [IC95%=0,98-2,61], P=0,060). *In silico* analysis suggests that substitutions T>C and A>G at intron 3 broke an exonic splicing silencer site, causing exon 3 removal and absence of domain for IgC2 mature protein. In conclusion, results suggest that polymorphisms in *VSIG4* gene modulate leprosy development and co-infection with HBV. Further studies enrolling other *VSIG4* polymorphisms as well as it's genic products may help to elucidate the role of this gene and CRIg proteins in leprosy and HBV co-infection.

Keywords: Leprosy; complement receptor; *VSIG4*; CRIg; hepatitis B.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - IMAGENS DO LEPROSÁRIO SÃO ROQUE EM 1926	21
FIGURA 2 - COEFICIENTE DE PREVALÊNCIA POR UF.....	23
FIGURA 3 – SÉRIE HISTÓRICA DO COEFICIENTE DE PREVALÊNCIA DA HANSENÍASE NO ESTADO DO PARANÁ	23
FIGURA 4 – LESÕES DE PELE OBSERVADAS NAS FORMAS CLÍNICAS DA HANSENÍASE	26
FIGURA 5 – FORMAS CLÍNICAS POLARES DA HANSENÍASE E RESPOSTA IMUNE	27
FIGURA 6 – RECONHECIMENTO, FAGOCITOSE E RESPOSTA IMUNE CONTRA O <i>M. LEPRAE</i>	29
FIGURA 7 - MODELO ESQUEMÁTICO DE SUSCETIBILIDADE GENÉTICA À HANSENÍASE	31
FIGURA 8 – CURSO SOROLÓGICO TÍPICO DA HEPATITE B	37
FIGURA 9 - VIAS DE ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO	39
FIGURA 10 – (A) RECEPTORES DO SISTEMA COMPLEMENTO E (B) OPSONIZAÇÃO MEDIADA POR C3B COM RECONHECIMENTO POR CRIG	41
FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA E LOCALIZAÇÃO DO GENE <i>VSIG4</i> NO CROMOSSOMO X	42
FIGURA 12 – TRANSCRITOS DO GENE <i>VSIG4</i> E ISOFORMAS (A) <i>VSIG4 001</i> , (B) <i>VSIG4-003</i> E (C) <i>VSIG4-201</i>	43
FIGURA 13 – QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE <i>VSIG4</i> EM DIVERSOS TECIDOS.....	44
FIGURA 14 – EXPRESSÃO DAS ISOFORMAS DO GENE <i>VSIG4</i> NO (A) TECIDO ADIPOSO, (B) PULMÃO, (C) BAÇO, (D) SANGUE TOTAL, (E) PELE NÃO EXPOSTA AO SOL E (F) NERVO TIBIAL	45
FIGURA 15 – ESTIMATIVA DA EXPRESSÃO DE CRIG	46
FIGURA 16 - FORMAS CLÍNICAS DOS PACIENTES COM HANSENÍASE DE (A) CURITIBA-PR E (B) SINOP-MT	51
FIGURA 17 - REGIÕES DO ACOPLAMENTO DOS INICIADORES DA PCR-SSP NO GENE <i>VSIG4</i>	56
FIGURA 18 - SNPS DO GENE <i>VSIG4</i> E PROTEÍNA CRIG.....	57

FIGURA 19 - PADRÃO ELETROFORÉTICO DA PCR-SSP REALIZADA PARA O GENE <i>VSIG4</i>	61
FIGURA 20 - DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS SNPS DO GENE <i>VSIG4</i> EM CURITIBA E SINOP.....	66
FIGURA 21 – SEQUÊNCIA DOS PASSOS MUTACIONAIS DOS HAPLÓTIPOS DO GENE <i>VSIG4</i> A PARTIR DO (A) ANCESTRAL AFRICANO E (B,C) POR RECOMBINAÇÃO	71
FIGURA 22 – NOMENCLATURA FILOGENÉTICA PROPOSTA PARA OS HAPLÓTIPOS DO GENE <i>VSIG4</i>	72
FIGURA 23 – EFEITO PROPOSTO PARA OS SNPS RS5964487 E RS9887348 NO PROCESSAMENTO ALTERNATIVO DO EXON 3.....	80
QUADRO 1 - LEPROSÁRIOS NO BRASIL	19
QUADRO 2 - FORMAS CLÍNICAS E CLASSIFICAÇÃO DA HANSENÍASE	26
QUADRO 3 – ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DOS POLIMORFISMOS RS5964487 E RS9887348.....	79

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DADOS DEMOGRÁFICOS DOS PACIENTES E CONTROLES	50
TABELA 2 - SEQUÊNCIA DOS INICIADORES PARA GENOTIPAGEM DO GENE <i>VSIG4</i>	55
TABELA 3 - CÁLCULOS DA REAÇÃO DE PCR-SSP PARA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO -1431, -685 DO PROMOTOR DO GENE <i>VSIG4</i>	58
TABELA 4 - CÁLCULOS DA REAÇÃO DE PCR-SSP PARA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO +6069, +6432 DO INTRON 1 - EXON 2 DO GENE <i>VSIG4</i>	59
TABELA 5 - CÁLCULOS DA REAÇÃO DE PCR-SSP PARA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO +10234,+10899 DO INTRON 3 DO GENE <i>VSIG4</i>	60
TABELA 6 – DIFERENCIAÇÃO POPULACIONAL (P ± DESVIO PADRÃO)*	65
TABELA 7 - FREQUÊNCIA GENOTÍPICA (%) DO <i>VSIG4</i> NO PROMOTOR, INTRON 1 – EXON 2 E INTRON 3 EM INDIVÍDUOS DE (A) CURITIBA E (B) SINOP	68
TABELA 8 - FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA (% ± DESVIO PADRÃO) DO GENE <i>VSIG4</i> EM CONTROLES E PACIENTES COM HANSENÍASE DE CURITIBA E SINOP	73
TABELA 9 - FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA (% ± DESVIO PADRÃO) DO GENE <i>VSIG4</i> EM CONTROLES E PACIENTES COM HANSENÍASE DE ACORDO COM O GRUPO ÉTNICO EM CURITIBA E SINOP	74
TABELA 10 - FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA (% ± DESVIO PADRÃO) DO GENE <i>VSIG4</i> DE ACORDO COM A FORMA CLÍNICA DA HANSENÍASE	75
TABELA 11 - FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA (% ± DESVIO PADRÃO) DO GENE <i>VSIG4</i> DE ACORDO COM A FORMA CLÍNICA DA HANSENÍASE	75
TABELA 12 - ASSOCIAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS DO GENE <i>VSIG4</i> COM HANSENÍASE*	76
TABELA 13 - ASSOCIAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS DO GENE <i>VSIG4</i> COM RELAÇÃO AOS POLIMORFISMOS DOS GENES <i>FCN1</i> E <i>FCN2</i> NA POPULAÇÃO DE CURITIBA	82
TABELA 14 - ASSOCIAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS DO GENE <i>VSIG4</i> COM HANSENÍASE E COINFECÇÃO PELO HBV EM CURITIBA.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anti-HBc IgM	anticorpos IgM contra o HBc
Anti-HBc total	anticorpos IgM e IgG contra o HBc
Anti-HBe	anticorpos contra o antígeno e do HBV
Anti-HBsAg	anticorpos contra o HBsAg
ASN	asiáticos
C3	componente 3 do complemento
C3a, C3b	fragmentos ativos de C3
C3c, C3d, iC3b	produtos de degradação do C3
CEU	Utah, Europeus
CLIC3	canal intracelular 3 de cloretos
CL-K1	colectina 10 ou renal 1
CL-L1	colectina 11 ou hepática 1
CLM	Colômbia
CRlg	receptor de complemento da superfamília das imunoglobulinas
CRlg (L)	isoforma longa de CRlg
CRlg (S)	isoforma curta de CRlg
CR1, 2, 3, 4	receptores de complemento 1, 2, 3 e 4
D'	desequilíbrio de ligação
DD	hanseníase dimorfa
DCs	células dendríticas
DEFB1	beta-defensina
DT	hanseníase dimorfa tuberculoide
DV	hanseníase dimorfa virchowiana
EBV	vírus Epstein-Baar
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FCN	ficolina
hab	habitantes
HBcAG	antígeno do core do HBV
HBeAg	antígeno e do HBV
HBsAg	antígeno de superfície do HBV

HBV	vírus da hepatite B
HCV	vírus da hepatite C
HLA	antígeno leucocitário humano
HT	hanseníase tuberculoide
HV	hanseníase virchowiana
HW	equilíbrio de Hard e Weinberg
IBS	Espanha
IC	intervalo de confiança
IFN- γ	interferon gama
IgC2	domínio C2 do CRIg
IgV	domínio V do CRIg
KC	células de Kupfer
IL-1, 4, 6, 8, 10	interleucinas 1, 4, 6, 8, 10
IL12B	interleucina 12 subunidade 40p
IL12BR2	receptor de interleucina beta-2
LAMA-2	alfa2-laminina-2
LOD	<i>log of the likelihood odds ratio score</i>
LPB21	laminina ligante de proteína
LT- α	linfotóxina alfa
LTHA4H	hidrolase de leucotrieno A4
LPS	lipopolissacarídeo
MASP	serina protease associada à MBL
MBL	lectina ligante de manose
MHC	complexo principal de histocompatibilidade
MRC1	receptor de manose
mRNA	RNA mensageiro
NO	óxido nítrico
NOD2	<i>nucleotide-binding oligomerization domain containing protein 2</i>
OR	<i>odds ratio</i> ou razão de chances
P	valor de probabilidade
PAMPs	padrões moleculares associados a patógenos
PACRG	<i>PARK2 co-regulated</i>

<i>PARK2</i>	<i>parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase</i>
PCR	reação em cadeia da polimerase
PCR-SSP	PCR sequência específica
PGL-1	glicolípido fenólico-1
Pré-mRNA	pré-RNA mensageiro
R	arginina
RPKM	<i>reads per kilobase per million mapped reads</i>
SNPs	polimorfismos de nucleotídeos únicos
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
Th1	linfócitos T auxiliares (<i>helper</i>) subtipo I
Th2	linfócitos T auxiliares (<i>helper</i>) subtipo II
TLR	receptores <i>Toll-like</i>
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
TCR	receptor de células T
UF	unidade da federação
VA	via alternativa do complemento
<i>VSIG4</i>	<i>v-set and Ig domain containing protein 4</i>
W	triptofano
YRI	Yoruba, Nigéria
YY1	Yin Yang 1
Z39Ig	sinônimo de CR1g

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1.1	Objetivo geral	17
1.1.2	Objetivos específicos	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	HISTÓRICO DA HANSENÍASE	18
2.3	AGENTE ETIOLÓGICO E TRANSMISSÃO DA HANSENÍASE	24
2.4	ASPECTOS CLÍNICOS E IMUNOLÓGICOS DA HANSENÍASE	25
2.4.1	Classificação da hanseníase	25
2.4.2	Reconhecimento celular e fagocitose do <i>Mycobacterium leprae</i>	28
2.5	GENÉTICA DA HANSENÍASE	31
2.6	ASSOCIAÇÃO DA HANSENÍASE E COINFECÇÃO COM HEPATITE B	36
2.7	SISTEMA COMPLEMENTO	38
2.7.1	Vias de ativação do sistema complemento	38
2.7.2	Ficolinas	39
2.7.3	Receptores do complemento	40
2.7.4	Receptor de Complemento da Superfamília das Imunoglobulinas (CRIg)	41
3	MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1	CASUÍSTICA	49
3.1.1	Pacientes	49
3.1.2	Grupo Controle	50
3.1.3	Dados demográficos e formas clínicas da hanseníase	50
3.2	MÉTODOS	52
3.2.1	Coleta de amostras	52
3.2.2	Extração do DNA genômico	52
3.2.3	Reação em Cadeia da Polimerase Sequência Específica (PCR-SSP)	53
3.2.3.1	PCR-SSP do gene <i>VSIG4</i>	54
3.3	ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DOS GENES <i>VSIG4</i> , <i>FCN1</i> e <i>FCN2</i>	62
3.4	MARCADORES PARA VÍRUS DA HEPATITE B	62
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	62
4	RESULTADOS	64
4.1	EQUILÍBRIO DE HARDY E WEINBERG	64
4.2	DIFERENCIAÇÃO POPULACIONAL	64

4.3. DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DO GENE <i>VSIG4</i>	65
4.4. SEQUÊNCIA DOS PASSOS MUTACIONAIS E ÁRVORE FILOGENÉTICA DOS HAPLÓTIPOS DO GENE <i>VSIG4</i>	67
4.5. FREQUÊNCIAS DOS HAPLÓTIPOS COMPLETOS DO GENE <i>VSIG4</i>	72
4.6. ASSOCIAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS COMPLETOS DO GENE <i>VSIG4</i> COM A HANSENÍASE	75
4.6.1 Associação com suscetibilidade à hanseníase	75
4.6.1.2 População de Curitiba	75
4.6.1.2 População de Sinop	77
4.6.2 Associação com proteção à hanseníase	78
4.6.2.1 População de Curitiba	78
4.6.2.2 População de Sinop	78
4.7 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DOS POLIMORFISMOS ASSOCIADOS	79
4.8 ASSOCIAÇÃO DO GENE <i>VSIG4</i> COM RELAÇÃO A POLIMORFISMOS DOS GENES <i>FCN1</i> E <i>FCN2</i> NA POPULAÇÃO DE CURITIBA	81
4.9 ASSOCIAÇÃO DO GENE <i>VSIG4</i> COM HANSENÍASE E COINFECÇÃO PELO VÍRUS HBV NA POPULAÇÃO DE CURITIBA.....	82
5 DISCUSSÃO	84
6 CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS	92
ANEXOS	103

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença milenar e mesmo após a descoberta da cura com a poliquimioterapia, continua presente nos países em desenvolvimento, causando graves problemas psicológicos, físicos e financeiros aos pacientes e familiares pelo seu poder incapacitante e pelo estigma da doença (BARBIERI; MARQUES, 2009).

O Brasil, com aproximadamente 31 mil casos novos registrados em 2013 é o segundo país do mundo em número de casos de hanseníase, ficando atrás apenas da Índia (127 mil novos casos), que tem uma população seis vezes maior (OMS, 2014).

A infecção pelo *Mycobacterium leprae*, bacilo intracelular causador da hanseníase, é transmitida principalmente pelas vias aéreas superiores. A grande maioria dos indivíduos infectados (cerca de 98-99%) é naturalmente resistente e não desenvolve a doença, o que indica forte relação com a resposta imunológica dos indivíduos (MIRA, 2006).

Entre os indivíduos que desenvolvem a doença são observadas duas formas polares distintas, a *tuberculoide* com uma resposta imune celular eficiente e baixo título de anticorpos (Th1), e a *virchowiana* com fraca resposta celular, alto título de anticorpos (Th2) e acentuada proliferação das micobactérias dentro dos macrófagos. Na forma *virchowiana* a ativação persistente e inadequada dos macrófagos resulta em lesões destrutivas na pele e tecidos subjacentes (MISCH et al, 2010).

A hanseníase é influenciada por fatores genéticos e várias associações de suscetibilidade e proteção foram relatadas na literatura (PREVEDELLO; MIRA, 2007). Dentre os genes associados com a doença estão: os genes *HLA*, *PARK/PACRG* e *IL-10* e os genes que codificam proteínas do sistema complemento *FCN*, *MASP* e *MBL* (BOLDT et al., 2013a, 2013b; MALHOTRA et al., 2005; MESSIAS-REASON et al., 2007, 2009; MIRA et al., 2004; SAUER et al., 2015; ZHANG et al., 2009).

O *M. leprae* necessita de células viáveis para se estabelecer no hospedeiro. Os receptores de complemento CR1, CR3 e CR4 estão associados com a fagocitose do bacilo pelos macrófagos (SCHLESINGER; HORWITZ, 1990). Recentemente, foi descrito um novo receptor de complemento da superfamília das imunoglobulinas

(CRIg) codificado pelo gene *V-set and Ig domain containing protein 4 (VSIG4)*. A proteína CRIg reconhece os fragmentos C3b, iC3b e C3c do complemento e está presente em altas concentrações nos macrófagos teciduais (WIESMANN et al., 2006; HE et al., 2006), célula alvo do *M. leprae*, sugerindo um possível papel na fagocitose do bacilo. Já foram descritas três variantes de *VSIG4*: VSIG4-001 e VSIG4-201, que codificam o CRIg com os domínios IgC2 e IgV; e a isoforma principal VSIG4-003, mais curta, que não expressa o domínio IgC2. A função de domínio IgV é de reconhecer patógenos opsonizados com C3b, enquanto que a função de IgC2 ainda não é conhecida (HELMY et al., 2006; WIESMANN et al., 2006; HE et al., 2008).

Pacientes com hanseníase são mais suscetíveis a coinfeções, especialmente a coinfeção pelo vírus da hepatite B (HBV) (revisto por LEITÃO et al., 2014). A diminuição da expressão de CRIg favorece a ação antiviral dos linfócitos T (via interferon γ) contra o HBV (GUO et al., 2010). Por isso, estudos deveriam ser conduzidos para elucidar uma possível associação do *VSIG4* com coinfeção hanseníase e hepatite B.

A história natural da hanseníase ainda é pouco compreendida e continua sendo um grande desafio. Um fator limitante para os avanços são as características do bacilo, que não se multiplica em meios de cultura *in vitro*. Diante deste contexto, estudos envolvendo fatores genéticos podem facilitar o desenvolvimento de medidas preventivas e estratégias terapêuticas da doença. No banco de dados do *Genbank* já foram descritos polimorfismos na região não codificadora e na região estrutural do gene *VSIG4*. Entretanto, estudos de polimorfismos no gene *VSIG4* e associação com doenças não foram publicados até o presente momento, justificando a realização deste estudo.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Verificar se existe associação entre os genótipos e haplótipos dos polimorfismos analisados do gene *VSIG4* e a hanseníase *per se*, assim como no desenvolvimento de subtipos de hanseníase e à coinfeção hanseníase – HBV em duas populações distintas (Curitiba-PR e Sinop-MT).

1.1.2 Objetivos específicos

- Desenvolver técnicas de tipagens por PCR-SSP de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) selecionados na região promotora, intron 1, exon 2 e intron 3 do gene *VSIG4*;
- Comparar a distribuição dos SNPs em grupos de pacientes e controles com populações investigadas pelo projeto 1000 Genomes;
- Estimar a frequência dos haplótipos compostos pelos SNPs investigados nas duas populações;
- Avaliar se polimorfismos e haplótipos de *VSIG4* estão associados com suscetibilidade à hanseníase e coinfeção com hepatite B e, se essas associações persistem após correção com outros polimorfismos previamente relacionados à doença em Curitiba-PR;
- Verificar se associações observadas em Curitiba-PR são replicadas na população de Sinop-MT.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HISTÓRICO DA HANSENÍASE

Desde o século 6 a.C. existem referências à hanseníase e acredita-se que a doença tenha surgido no Oriente, com referências da doença na Índia, na China e no Egito. A disseminação ocorreu provavelmente através de tribos nômades ou por navegadores fenícios (BRASIL, 1989).

Também vulgarmente conhecida como lepra ou mal de Lázaro, antigamente era associada ao pecado, à impureza, à desonra. Quando não eram enviados para leprosários ou lazaretos, local destinado a abrigar os doentes de Lázaro, e excluídos da sociedade, os doentes não podiam entrar em igrejas, tinham que usar luvas e roupas especiais, carregar sinetas ou matracas que anunciassem sua presença (BRASIL, 1989).

Segundo a Lei de Strasbourg, no final do século XV, um paciente com suspeita da doença deveria ser examinado por quatro pessoas: um médico, um cirurgião e dois barbeiros. O diagnóstico era realizado com uma pequena amostra de sangue a qual era depositada em um recipiente com sal. Se o sangue se decompusesse, o paciente era são, caso contrário, era considerado doente. Outra técnica consistia em misturar a água com o sangue. Se a mistura dos dois líquidos fosse impossível, tratava-se do sangue de um hanseniano. Quando se juntavam gotas de sangue ao vinagre, se não houvesse formação de bolhas, igualmente era firmado o diagnóstico de hanseníase (OPROMOLLA, 1981 apud EIDT, 2004).

A bactéria *Mycobacterium leprae* foi identificada somente em 1873, pelo norueguês Armauer Hansen, porém, o preconceito persistiu, e a exclusão social dos acometidos foi até mesmo reforçada pela teoria de que o confinamento dos doentes era o caminho para a extinção do mal (BRASIL, 1989).

Os primeiros casos da doença no Brasil foram notificados em 1600, na cidade do Rio de Janeiro e, anos mais tarde, seria criado o primeiro lazareto ou leprosário. Os doentes eram obrigados a se isolar em leprosários e tinham seus pertences queimados (YAMANOUCHI et al, 1993; BRASIL, 1989). No quadro 1,

estão listados alguns dos leprosários do Brasil e suas respectivas datas de inauguração.

ESTADO/TERRITÓRIO	INSTITUIÇÃO	ANO INAUGURAÇÃO
Acre	Lazareto Souza-Araújo Cruzeiro do Sul	1930
Amazonas	Asilo de leprosos de Umirisal Leprosário do Paredão do Rio Verde Colônia Antônio Aleixo	1930 1929 1942
Pará	Hospital de Lázaros Hospital Frei Gil Vila Nova Colônia Marituba Colônia do Prata	1816 1939 1942 1924
Maranhão	Hospital de Lázaros Asilo de Lázaros Colônia Bonfim	1833/1870 1870 1937
Ceará	Colônia Antônio Diogo	1928 1941
Rio Grande do Norte	Colônia São Francisco de Assis	1929
Paraíba	Colônia Getúlio Vargas	1941
Pernambuco	Hospital dos Lázaros Hospital de Lázaros Colônia Mirueira	1789/1941 1878 1941
Sergipe	Colônia Lourenço Magalhães	1945
Bahia	Hospital de São Cristovão dos Lázaros Colônia de Águas Claras	1787/1945 1949
Minas Gerais	Homens	1771
Espírito Santo	De Nossa Senhora das Dores Colônia Santa Isabel Colônia Santa Fé Colônia São Francisco de Assis Sanatório Roça Grande Colônia Padre Damião	1817 1931 1942 1943 1944 1945
Rio de Janeiro	Colônia Itanhega Hospital dos Lázaros Hospital Frei Antônio	1937 1741 1793
Distrito Federal	Colônia Curupaiti	1928
São Paulo	Colônia Aimorés Asylo de Morphéticos Hospital de Lázaros Hospital de Morphéticos Asylo de Morphéticos Asylo São Lázaro Colônia Santo Ângelo	1933 1911 1863/1872 1872 1912/1932 1905 1928
Paraná	Lazareto São Roque Colônia São Roque	1926 1926
Santa Catarina	Colônia Santa Tereza	1940
Rio Grande do Sul	Colônia Itapoã Hospital de Emergência para leprosos	1940 1937
Mato Grosso	Hospital São João dos Lázaros	1816
Goiás	Colônia Santa Marta Leprosário Helena Bernard	1943 1929

QUADRO 1 - LEPROSÁRIOS NO BRASIL

FONTE: Adaptado de Castro (2005).

Dentre esses, os leprosários paulistas, o lazareto São Roque e o asilo de Manaus formaram o primeiro grupo de espaços específicos para leprosos construídos na Primeira República. No Paraná, destaca-se o leprosário São Roque, inaugurado em 1926, trazia a promessa de resolver o problema dessa doença no estado. A matéria publicada no jornal Gazeta do Povo de 21 de outubro de 1926 (apud CASTRO, 2005) mostrava essa grande expectativa:

“O PROBLEMA DA LEPROSA RESOLVIDO NO PARANÁ

A inauguração do Leprosário São Roque – cerca de 1500 pessoas assistiram o acto.

Inaugurou-se hontem, conforme fora previamente anunciado, o modelar estabelecimento que é o Leprosario São Roque, mandado construir pelo Dr. Munhoz da Rocha, benemérito presidente do Estado.

Edificado na villa de Deodoro, o Leprosario São Roque é um estabelecimento modelar sob todos os pontos, de extraordinarias proporções dispondo de todos os requisitos indispensaveis para bem corresponder aos seus uteis fins.

Dispõe de capacidade para abrigar 300 enfermos, com instalações adequadas para os doentes e bem assim de casas de morada para as famílias dos mesmos. As suas dependencias, que são em grande numero, acham-se dispostas de accordo com o inteligente plano traçado para a construção do util estabelecimento que tão dignifica o Paraná, não somente porque o nosso Estado vem de patentear o seu dever de oppor barreiras a um dos mais hediondos males que desimam a humanidade, como tambem o de demonstrar a outros Estados da Republica, que é o primeiro a lançar as bases de um grande monumento erguido para o bem do povo, para o progresso da civilização e de conformidade com os mais recentes preceitos da sciencia moderna.

(...)

A cerimonia do acto inaugural revestiu-se de excepcional solemnidade, com a presença do Sr. Presidente do Estado, de d. João Braga, Arcebispo de Curityba, Coronel Alcides Munhoz, Secretario Geral d’Estado, Desembargador Albuquerque Maranhão, Chefe da Policia, cónsules, demais autoridades civis e militares, representantes da imprensa e convidados.

Conduzindo-os seguiram desta capital dois trens, levando cada um delles doze carros, com os convidados do Sr. Presidente do Estado, em numero de 1500 pessoas mais ou menos.

(...)”.

O leprosário São Roque foi idealizado como uma colônia, traduzindo o pensamento científico mais moderno existente até então. Toda essa estrutura visava a independência da cidade e os funcionários e médicos dispunham de moradia (CASTRO, 2005) (Figura 1).

Entretanto, essas instituições tornaram-se locais de segregação de doentes e contribuíram ainda mais para o aumento do estigma que cerca a doença e somente em 1962 a internação compulsória foi abolida.



FIGURA 1 - IMAGENS DO LEPROSÁRIO SÃO ROQUE EM 1926

NOTA: (A) Missa de Inauguração; (B) Vista da colônia; (C) Consultório; (D) Laboratório; (E) Sala de parto; (F) Refeitório coletivo; (G) Dormitório coletivo, (H) Vista da colônia.

FONTE: Acervo fotográfico do Hospital São Roque.

Em 1995, foi sancionada a lei nº 9.010, que proibiu o uso da denominação lepra e seus derivados nos documentos oficiais da administração brasileira, em uma tentativa de reduzir o estigma da doença (BRASIL, 1995).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pela bactéria *M. leprae* que afeta primariamente a pele e o sistema nervoso periférico (PREVEDELLO; MIRA, 2007). Essa enfermidade afeta a humanidade há milênios e mesmo não sendo uma doença altamente transmissível e que apresenta um tratamento quimioterápico eficiente há pelo menos 60 anos, continua afetando de forma expressiva populações de países em desenvolvimento da Ásia, África, América Latina e do Pacífico (MISCH et al., 2010).

A hanseníase está intrinsecamente associada com pobreza e residência rural e mais de 80% dos casos ocorrem na Índia, China, Mianmar, Indonésia, Brasil, Nigéria, Madagascar e Nepal. Em 2013, foram reportados aproximadamente 216.000 novos casos de hanseníase, predominantemente na Índia (126.913), Brasil (31.044) e Indonésia (16.856) (OMS, 2014).

Entre os anos de 2006 a 2013 houve uma diminuição progressiva nos casos novos de hanseníase nas Américas, de 47.612 em 2006 para 33.084 casos em 2013 (redução de 30,5%). Destes, o maior número de casos ocorreram no Brasil (31.044), representando 93,9% do total nas Américas. Assim, a hanseníase continua sendo um problema para a saúde pública do país, com prevalência de 1,42 casos por 10.000 habitantes (hab) em 2013 (OMS, 2014). Cabe ressaltar que a Organização Mundial de Saúde utiliza o padrão de menos de um caso por 10.000 habitantes para que a hanseníase não represente um problema de saúde pública para o país.

Em 2014, dados preliminares do Ministério da Saúde do Brasil indicam que uma incidência de 12,14 por 100 mil hab. Embora a doença apresente tendência de se estabilizar no país, ainda apresenta índices muito altos nas regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste. A maior prevalência foi observada no Estado do Mato Grosso (9,03 casos/10.000 hab), enquanto que a menor foi observada no Estado do Rio Grande do Sul (0,13 casos/10.000 hab). Nove unidades da federação estão com prevalência menor que 1/10.000 hab (Figura 2) (BRASIL; 2014). Segundo a Secretaria de Saúde do Paraná, o estado está próximo de eliminar a hanseníase como problema de saúde pública. O estado teve um decréscimo significativo na prevalência da hanseníase, de 2,1 casos por 10.000 hab em 2004, para 0,9 casos por 10.000 hab em 2013 (Figura 3) (PARANÁ, 2014a).

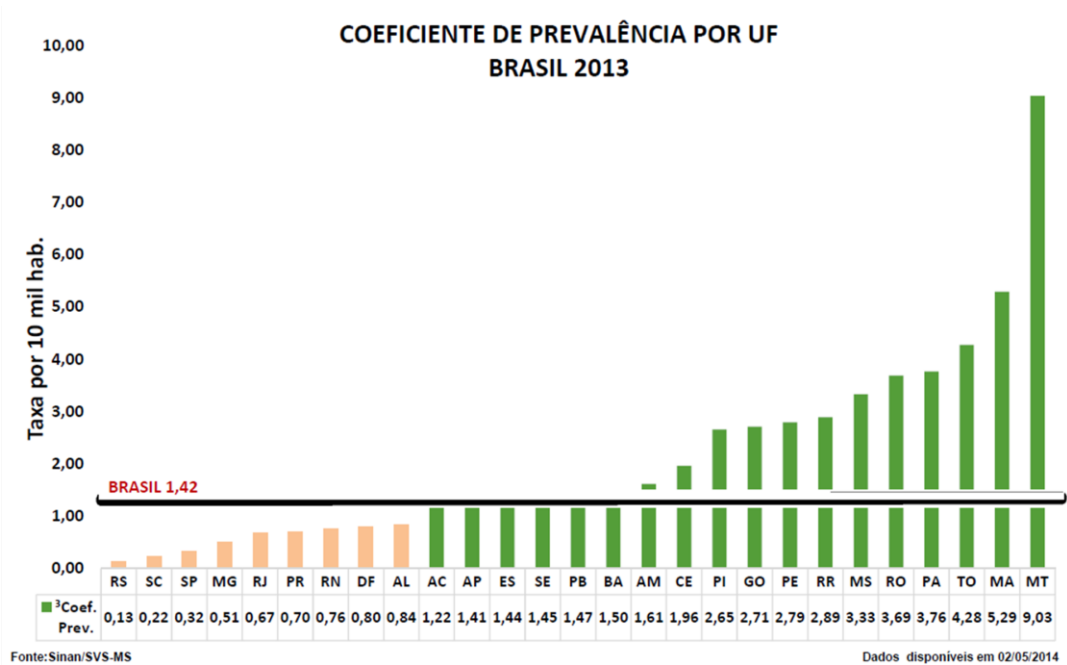


FIGURA 2 - COEFICIENTE DE PREVALÊNCIA POR UF

LEGENDA: UF = unidade da federação; hab. = habitantes

FONTE: BRASIL, 2014.

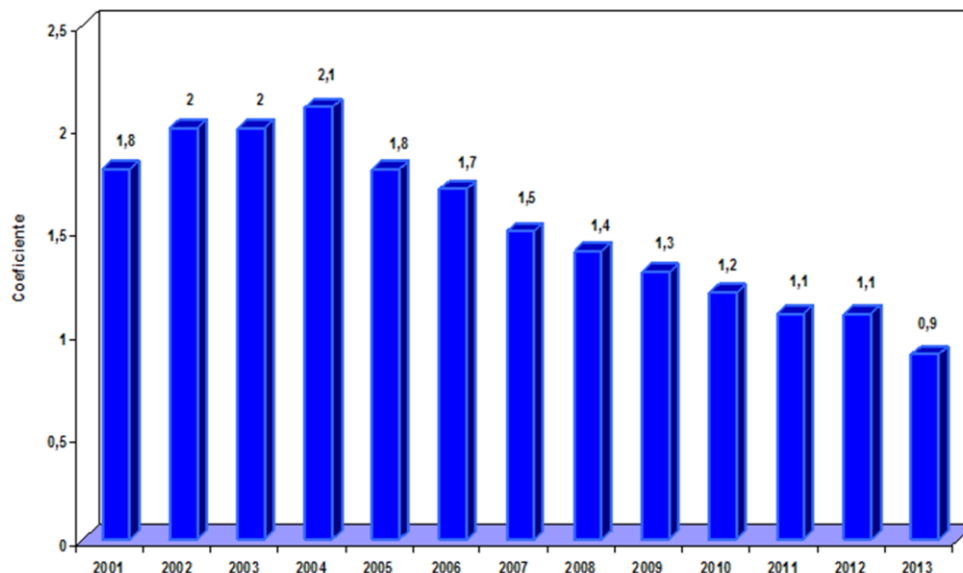


FIGURA 3 – SÉRIE HISTÓRICA DO COEFICIENTE DE PREVALÊNCIA DA HANSENÍASE NO ESTADO DO PARANÁ

LEGENDA: Coeficiente = número de casos/10.000 habitantes.

FONTE: Secretaria de Estado da Saúde do Paraná/SVS/CEPI/DVVTR/CEPCH/SINANNET Acesso em: 22/05/2014.

A hanseníase pode acometer todas as faixas etárias, sendo, no entanto mais comum em adultos. A prevalência da doença em menores de 15 anos é maior em

países endêmicos, sendo que 20% dos novos casos na Índia ocorrem em menores de 15 anos. No Brasil esse índice é de cerca de 6% (JAIN et al., 2002; BRASIL, 2014).

Em relação à distribuição por sexo, homens têm um risco duas vezes maior ($IC_{95\%}=1,2-4,1$) de desenvolver hanseníase em relação às mulheres (BAKKER et al., 2006; PETER; ESHIET, 2002). No Brasil, há uma tendência maior de acometimento dos homens, com aproximadamente 57% dos casos de hanseníase (BRASIL, 2014).

Longe de ser erradicada, pesquisas científicas envolvendo estudos de associação, como propostos neste estudo, podem contribuir para a terapêutica e profilaxia da hanseníase. Novas descobertas certamente poderão causar impacto na saúde pública e social do nosso país.

2.3 AGENTE ETIOLÓGICO E TRANSMISSÃO DA HANSENÍASE

O *Mycobacterium leprae*, agente causador da hanseníase, é um bacilo álcool-ácido resistente, não cultivável em laboratório e de multiplicação lenta (11 - 16 dias). É um micro-organismo intracelular obrigatório, com capacidade de infectar principalmente macrófagos e células de Schwann do sistema nervoso periférico (BRASIL, 2002; MISCH et al., 2010).

O *M. leprae* apresenta alta infectividade (capaz de infectar grande número de pessoas) e baixa patogenicidade (poucos adoecem), com período de incubação prolongado, estimado de 2 a 7 anos (BRASIL, 2002). Acredita-se que a principal via de transmissão da hanseníase seja através da eliminação de gotículas nasais de pessoa para pessoa. As vias aéreas superiores (mucosa nasal e orofaringe) são a principal via de eliminação e infecção, podendo também ser transmitido por contato direto entre a lesão do indivíduo doente e a pele de indivíduos saudáveis que não esteja íntegra (SCHOREY et al., 1995; SOUZA, 1997; GELBER, 2008).

Os pacientes multibacilares, que apresentam mais de cinco lesões de pele e/ou nervos periféricos acometidos, podem transmitir o *M. leprae* antes de iniciar o tratamento com poliquimioterápicos e, portanto, o contato próximo com esses

indivíduos constitui um risco aumentado de desenvolvimento da doença (JOB et al., 2008; RODRIGUES; LOCKWOOD, 2011).

2.4 ASPECTOS CLÍNICOS E IMUNOLÓGICOS DA HANSENÍASE

2.4.1 Classificação da hanseníase

A hanseníase sintomática apresenta duas formas clínicas polares, a tuberculoide (leve a moderada) e a virchowiana (grave). Entre as formas clínicas tuberculoide e virchowiana, podem ser observadas formas clínicas intermediárias denominadas tuberculoide limítrofe (*boderline* ou dimorfa) e virchowiana limítrofe (*boderline* ou dimorfa), como também a forma indeterminada (RIDLEY; JOPLING, 1966) (Quadro 2). A hanseníase tuberculoide (HT) acomete indivíduos resistentes ao *M. leprae*, sendo uma forma mais benigna e localizada, embora os danos teciduais e neurológicos sejam frequentes. No lado oposto, indivíduos com alta suscetibilidade à infecção apresentam a hanseníase virchowiana (HV), com numerosas lesões de pele e crescimento descontrolado dos bacilos, resultando em grande quantidade de *M. leprae* viáveis nas lesões da pele (Figura 4). Pacientes com as formas clínicas tuberculoide e indeterminada, podem evoluir para cura espontânea, porém isso não ocorre em pacientes virchowianos (MISCH et al, 2010). A doença é altamente incapacitante e comprometimento sistêmico é relatado em alguns casos (RENAULT; ERNST, 2010). Para fins de tratamento, os pacientes são classificados de acordo com o número de lesões de pele e/ou número de nervos acometidos em multibacilares, com mais de cinco, e paucibacilares, com menos de cinco (Quadro 2) (OMS, 1982; BARBIERE; MARQUES, 2009).

A apresentação clínica está relacionada com o tipo de imunidade do indivíduo. A HT está associada com a ativação do subtipo Th1 dos linfócitos T CD4+ (T auxiliares ou Th). As células Th1 produzem IL-2, interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), ativando preferencialmente os macrófagos, eliminando

CLASSIFICAÇÃO DE RIDLEY-JOPLING	APRESENTAÇÃO CLÍNICA	BACILOSCOPIA	CLASSIFICAÇÃO OPERACIONAL VIGENTE PARA REDE BÁSICA (OMS)
Indeterminada	Áreas de hipo ou anestesia, parestesias, manchas hipocrômicas e/ou eritemato-hipocrômicas, com ou sem diminuição da sudorese e rarefação de pelos	Negativa	Paucibacilar Até 5 lesões de pele e/ou apenas 1 tronco nervoso acometido
Tuberculoide (HT)	Placas eritematosas, eritemato-hipocrômicas, bem definidas, hipo ou anestésicas, comprometimento de nervo	Negativa	
Dimorfa (<i>Boderline</i> ou Limítrofe)	Lesões pré-foveolares (eritematosas planas com o centro claro). Lesões foveolares (eritematopigmentares, de tonalidade ferruginosa ou pardacenta). Apresenta alterações de sensibilidade	negativa ou positiva	Multibacilar Mais que 5 lesões de pele e/ou mais de 1 tronco nervoso acometido
Virchowiana (HV)	Eritema e infiltração difusa, placas eritematosas infiltradas e de bordas mal definidas, tubérculos e nódulos, madarose, lesões das mucosas, com alteração de sensibilidade	Positiva	

QUADRO 2 - FORMAS CLÍNICAS E CLASSIFICAÇÃO DA HANSENÍASE

LEGENDA: OMS = Organização Mundial da Saúde.

FONTE: BARBIERE; MARQUES, 2009.

Formas clínicas



Indeterminada



Tuberculoide



Dimorfa



Virchowiana

FIGURA 4 – LESÕES DE PELE OBSERVADAS NAS FORMAS CLÍNICAS DA HANSENÍASE

FONTE: PARANÁ, 2014b.

ou inibindo o crescimento do *M. leprae*, resultando em doença moderada ou cura. Já a HV está associada com resposta do subtipo Th2, com síntese de IL-4, IL-5 e IL-10, ampliando a resposta humoral (MODLIN, 1994). Como auxílio diagnóstico, realiza-se a reação de Mitsuda, que verifica se há resposta imune de hipersensibilidade tardia após administração intradérmica dos antígenos de *M. leprae* (mitsudina). Como resultado, pode apresentar reação positiva forte em pacientes com a forma tuberculoide e reação negativa ou fraca em pacientes com a forma virchowiana. Em pacientes com a forma clínica dimorfa, a intradermorreação de mitsuda (IRM) é uma importante ferramenta para avaliar o prognóstico da doença (RIDLEY; JOPLING, 1966; MISCH et al., 2010) (Figura 5).

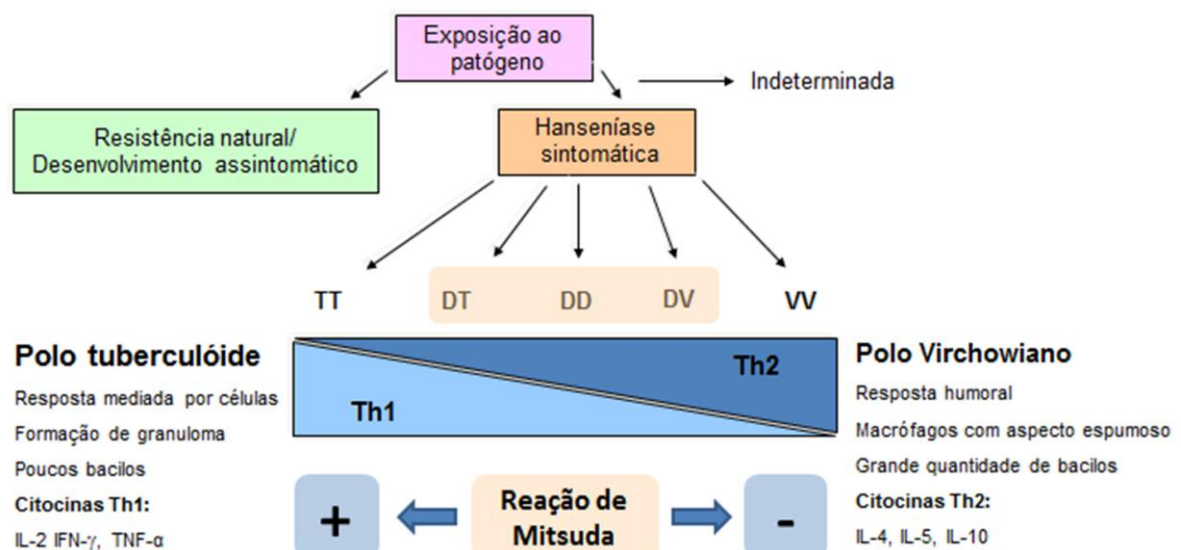


FIGURA 5 – FORMAS CLÍNICAS POLARES DA HANSENÍASE E RESPOSTA IMUNE

LEGENDA: HT = tuberculoide; DT = dimorfa tuberculoide; DD = dimorfa; DV = dimorfa virchowiana; HV = virchowiana; Th1 e Th2 = linfócitos T auxiliares 1 e 2; (+) = positiva; (-) = negativa; IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 = interleucinas 2, 4, 5 e 10; IFN- γ = interferon gama; TNF- α = fator de necrose tumoral alfa.

FONTE: Adaptado de MISCH et al, 2010.

Os linfócitos Th2 facilitam a resposta humoral e inibem a resposta imune mediada por células pela supressão dos macrófagos, favorecendo o crescimento dos bacilos da hanseníase (MODLIN, 1994; DOCKRELL et al., 1996). Um dos mecanismos de evasão do *M. leprae* é a inibição da produção da IL-2 e consequentemente inibição da proliferação das células T (DAGUR et al., 2010).

Pacientes com hanseníase podem apresentar dois tipos de reações imunológicas (reações hansênicas). A reação do tipo I ou reação reversa com ativação súbita da resposta Th1 inflamatória contra os antígenos do *M. leprae*. A

reação tipo I ocorre mais frequentemente em pacientes dimorfos, geralmente após o início do tratamento, e se caracteriza por apresentar novas lesões dermatológicas (manchas ou placas), que podem ser eritemato-infiltradas (aspecto erisipelóide), alterações de cor e edema nas lesões antigas, bem como dor ou espessamento dos nervos (neurites) (BRASIL, 2002; MISCH et al, 2010).

A reação do tipo 2 ou eritema nodoso é uma condição inflamatória aguda com elevadas concentrações de fator de necrose tumoral (TNF), infiltração tecidual de células CD4+ e neutrófilos, deposição de imunocomplexos e proteínas do complemento, resultando em vasculopatia associada a formação de imunocomplexos, paniculite e uveíte. O eritema nodoso se caracteriza por apresentar nódulos vermelhos e dolorosos, febre, dores articulares, dor e espessamento nos nervos e mal-estar generalizado. Geralmente as lesões antigas permanecem sem alteração (BRASIL, 2002; MISCH et al, 2010).

2.4.2 Reconhecimento celular e fagocitose do *Mycobacterium leprae*

A imunidade inata é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra infecções. O reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS) é essencial para ativação de proteínas do complemento, fagocitose e destruição de micro-organismos patogênicos. A internalização de patógenos por macrófagos (fagocitose) através de receptores celulares possibilita a rápida destruição dos micro-organismos evitando infecções. Entretanto, essa via também pode ser utilizada como porta de entrada para patógenos intracelulares obrigatórios proporcionando um habitat celular, como é o caso do *M. leprae*. (ABBAS et al., 2008; MISCH et al., 2010; SCHLESINGER; HORWITZ, 1990, 1991).

Schlesinger & Horwitz (1990) relataram vias de infecção do *M. leprae* em fagócitos mononucleares, relacionadas a ativação do Sistema Complemento. Os autores observaram que o componente C3 é fixado na superfície bacteriana através da ativação da via alternativa do complemento, atuando como ligante para os receptores CR3 em monócitos e CR1 e CR4 em macrófagos. Esses receptores mediam a fagocitose, a qual acontece através da via convencional. Além disso, os autores determinaram que a ligação de C3 acontece de maneira específica ao

glicolípido fenólico-1 (PGL-1), uma molécula presente em grande quantidade na superfície do bacilo (SCHLESINGER; HORWITZ, 1991). A molécula PGL-1 também está envolvida na infecção das células de Schwann no sistema nervoso periférico (Ng et al., 2000) (Figura 6).

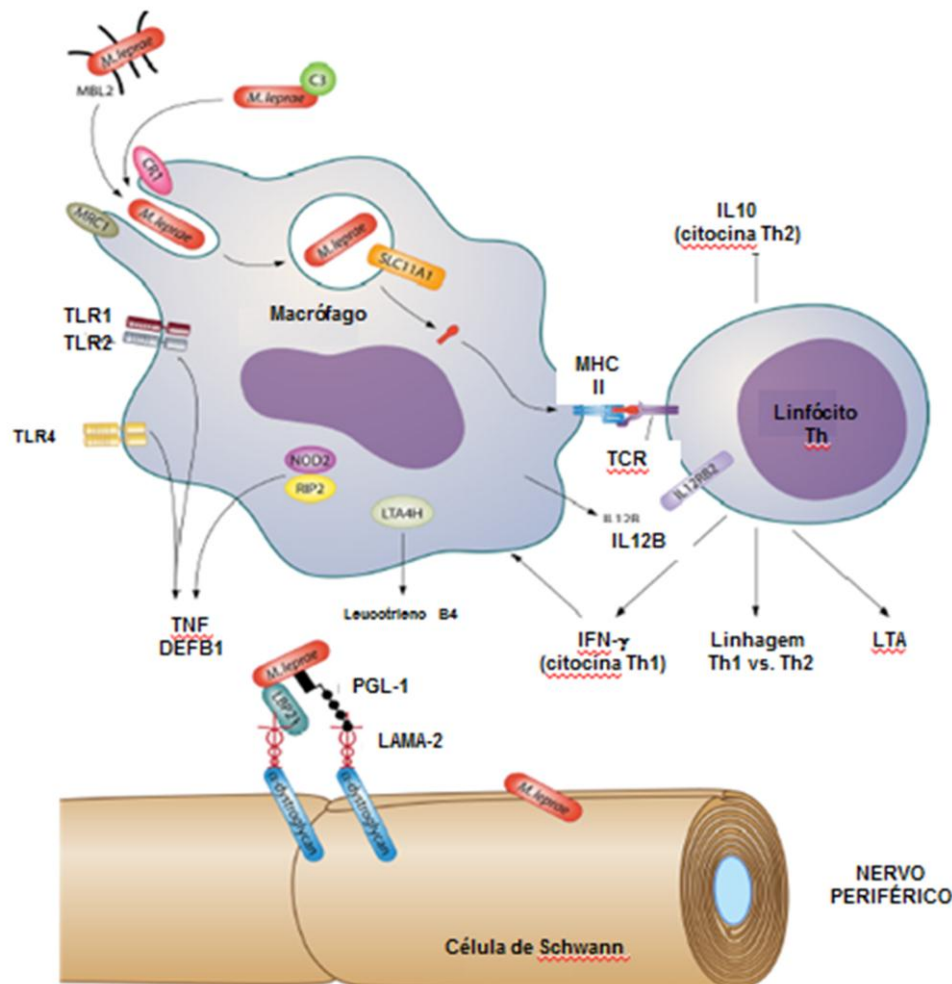


FIGURA 6 – RECONHECIMENTO, FAGOCITOSE E RESPOSTA IMUNE CONTRA O *M. LEPRAE*

LEGENDA: LPB21 = laminina ligante de proteína 21; PGL-1 = glicolípido fenólico-1; C3 = proteína 3 do complemento; CR1 = receptor de complemento 1; DEFB1 = beta-defensina-1; IFN- γ = interferon gama; IL-10 = interleucina 10; IL12B = interleucina 12 subunidade 40p; IL12BR2 = receptor de interleucina beta-2; LTA4H = hidrolase de leucotrieno A4; LTA = linfotóxina α ; TNF = fator de necrose tumoral; MBL 2 = lectina ligante de manose 2; MRC1 = receptor de manose; LAMA2 = α 2-laminina-2; TCR = receptor de células T; Th1 e Th2= célula T auxiliar 1 e 2.

FONTE: Adaptado de MISCH et al., 2010.

Estudos demonstraram que os receptores *Toll-like* (TLR) e a lectina ligante de manose (MBL) modulam a resposta imunológica contra o *M. leprae*. Os TLR são proteínas transmembrânicas que orquestram a resposta imune inata contra os PAMPs. Os receptores TLR tipo 1, 2, 4, 9, e predominantemente o heterodímero TLR2/1 foram associados com a hanseníase (BOCHUD et. al., 2003; MISCHE et al.

2010). Já a MBL, uma das principais moléculas na ativação da via das lectinas do sistema complemento se mostrou associada às formas clínicas da hanseníase (DORNELLES et al, 2006; IP et al. 2008).

Na hanseníase, os receptores TLR reconhecem os PAMPs do *M. leprae* e têm o papel de transdução de sinal para a síntese de citocinas pró-inflamatórias (TNF) e DEFB1 (peptídeo microbicida) pelos macrófagos. A opsonização da bactéria por C3 ocorre pela ativação das vias alternativa (ligação direta do C3) e das lectinas, estimulando a fagocitose do *M. leprae* pelo macrófago que reconhece o fragmento C3b através do receptor CR1. Posteriormente, inicia-se a resposta imune adquirida, com a apresentação de antígenos bacterianos pelo macrófago via MHC classe II às células Th, ativando-as. A ativação de células Th1 desencadeia uma resposta imune celular relacionada à forma tuberculoide da hanseníase, enquanto que uma resposta Th2 produz anticorpos contra o bacilo e está relacionada à forma clínica virchowiana. Já a infecção das células de Schwann ocorre através da interação da moléculas PGL-1 e LPB21 do *M. leprae* com a proteína LAMA2 e α -distroglicano da célula de Schwann (Figura 6) (MISCH et al., 2010).

Desta forma, atualmente sabe-se que a exposição ao *M. leprae* não é condição única para desenvolvimento da hanseníase e diferentes conjuntos de genes estão relacionados com a suscetibilidade do hospedeiro à esta doença. Sauer e colaboradores (2015) citam três diferentes conjuntos de genes que controlariam três diferentes estágios desde a exposição até o desenvolvimento da doença:

- I) Controle da infecção independentemente da sua manifestação clínica (hanseníase *per se*);
- II) Após a infecção estar estabelecida, determinam o tipo de resposta imune do hospedeiro e a forma clínica da doença;
- III) Relacionados ao risco de desenvolvimento de reações hansênicas (Figura 7).

A partir da observação de que existe um importante componente genético no controle da suscetibilidade à hanseníase torna-se necessário a condução de estudos que identifiquem os genes e as suas variantes relacionadas com os diferentes fenótipos encontrados na hanseníase. Nas últimas décadas diversos estudos foram realizados e identificaram diferentes genes e suas variações envolvidos na suscetibilidade e progressão clínica da hanseníase.

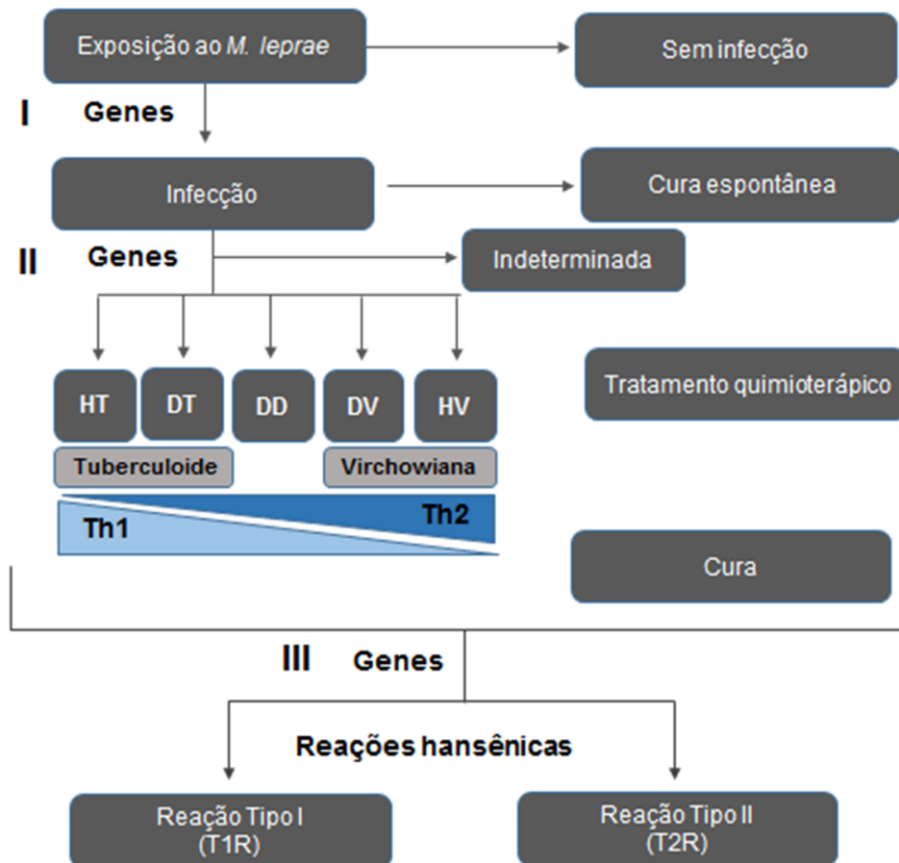


FIGURA 7 - MODELO ESQUEMÁTICO DE SUSCETIBILIDADE GENÉTICA À HANSENÍASE

LEGENDA: HT = hanseníase tuberculoide; DT = dimorfa tuberculoide; DD = dimorfa; DV = dimorfa virchowiana; HV = hanseníase virchowiana; PB (paucibacilar); MB (multibacilar); Th1 e Th2 = linfócitos T auxiliares subtipos 1 e 2; I = genes que controle a infecção independente da manifestação clínica (hanseníase per se); II = genes que determinam o tipo da resposta imune do hospedeiro e a forma clínica da hanseníase; III = genes relacionados ao risco de desenvolver reações hansênicas.

FONTE: Adaptado de SAUER *et al.*, 2015.

2.5 GENÉTICA DA HANSENÍASE

Estudos demonstraram duas associações independentes de suscetibilidade à hanseníase com o Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), nas regiões HLA-B, HLA-C e HLA-DR-DQ. Zhang e colaboradores (2009) identificaram que polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) presentes na região HLA-DR-DQ (rs602875) estão fortemente associados com a suscetibilidade à hanseníase na

população chinesa. O HLA de classe I também foi estudado e foi observado que os alelos *A*206*, *A*1102*, *B*4016*, *B*5110*, *Cw*0407* e *Cw*0703*, apresentaram frequência significativamente maior em pacientes indianos com hanseníase quando comparados com os controles não doentes (SHANKARKUMAR, 2004).

Outro importante estudo de associação do complexo HLA e a suscetibilidade à hanseníase foi conduzido com 198 pacientes com hanseníase na população vietnamita. Foram analisados 682 SNPs em uma região de 1.9 Mb na região do complexo HLA. Destes, foram encontrados 59 associados com a suscetibilidade à hanseníase. Cabe ressaltar, que essa associação foi significativa estatisticamente apenas em pacientes com idade maior que 15 anos na época do diagnóstico. Em uma segunda etapa, os autores genotiparam esses SNPs em 292 pacientes com hanseníase (54% multibacilar) e evidenciaram uma associação com 12 SNPs, que correspondem a região intergênica de HLA Classe I e do alelo *HLA-C*15:05* na população vietnamita. Para validação desses resultados os autores utilizaram uma terceira amostra (constituída de 364 pacientes), geograficamente e etnicamente diferente, do norte da Índia, e demonstraram uma associação positiva entre os 12 SNPs genotipados e a suscetibilidade a hanseníase. Desta forma, os autores demonstraram uma relação entre os alelos HLA Classe I e a patogênese da doença (ALTER et al., 2011).

O papel das citocinas linfoquina alfa ($LT-\alpha$) e $TNF-\alpha$ é essencial, porém distinto, no recrutamento e manutenção da resposta granulomatosa durante a infecção por *M. leprae*. A $LT-\alpha$ regula a formação do granuloma enquanto o $TNF-\alpha$ é responsável por sua integridade (HAAGE et al., 2009). Cardoso e colaboradores (2011) demonstraram que pacientes portadores do alelo -308A produziam altos níveis de $TNF-\alpha$ após estímulo com *M. leprae* e lipopolissacarídeo (LPS) e consequente resistência a doença foi demonstrada especialmente em pacientes brasileiros.

Estudos desenvolvidos com animais *knockout* para os genes das linfoquinas, indicaram que a $LT-\alpha$ possui um importante papel no controle de infecções por patógenos intracelulares como *M. tuberculosis* e *M. leprae* e consequente formação de granulomas (ROACH et al., 2001).

A Interleucina-10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória, secretada por monócitos/macrófagos e linfócitos T (T auxiliar subtipo 1 e T reguladoras)

(CARDOSO et al., 2011; KUHN et al, 1993). A IL-10 bloqueia a produção de citocinas pró-inflamatórias e a propriedade apresentadora de antígeno de macrófagos (KUHN et al, 1993). A IL-10, juntamente com a IL-4, é determinante para o desenvolvimento fenotípico das células T auxiliares (HSIEH et al., 1993), além de inibir a produção de IL-1, IL-6, TNF- α em macrófagos ativados por LPS e IFN- γ (ISHIDA et. al., 1993).

A proporção de TNF- α /IL-10 é essencial para restringir a proliferação e o desenvolvimento inicial da infecção por *M. leprae*. O perfil de secreção de IL-10 mostrou-se alterado nos pacientes pós-tratamento de hanseníase, esses secretam níveis relativamente altos em resposta ao *M. leprae* (LIMA et al., 2000). Em estudo realizado *in vitro*, a IL-10 favoreceu a viabilidade do *M. leprae* em macrófagos infectados (FUKUTOMI et al., 2008).

Santos e colaboradores (2002) também relataram uma associação entre o genótipo -819TT, no promotor da IL-10 e o desenvolvimento da hanseníase paucibacilar. Outros polimorfismos (T-3575A, A-2849G, C-2763A, A-1082G e C-819T) também foram avaliados em pacientes com hanseníase e comparados com indivíduos saudáveis. O haplótipo -3575A/-2849G/-2763C (AGC) foi associado com a resistência a hanseníase e desenvolvimento das formas mais graves da doença (MORAES et al., 2004). Malhotra e colaboradores (2005) realizaram um estudo de investigação de seis SNPs no promotor IL-10 em 282 pacientes indianos. Os autores também associaram o haplótipo -3575T/-2849G/-2763C/-1082A/-819C/-592C (TGCACC) com resistência a hanseníase per se e desenvolvimento de formas severas da hanseníase. O haplótipo -3575T/-2849G/-2763C/-1082A/-819T/-592A (TGCATA) foi associado com o risco de desenvolvimento das formas mais graves em contraste com o menor risco do haplótipo -3575T/-2849A/-2763C (TAC) encontrados na população brasileira. Juntos, esses resultados encontrados para os SNPs do promotor da IL-10, nas amostras de brasileiros e indianos, sugere fortemente a participação desse locus no desenvolvimento da hanseníase.

A associação do alelo -819T também foi relacionada com menores níveis de produção de IL-10 no sangue periférico de indivíduos expostos ao *M. leprae* quando comparado com indivíduos sem esse alelo. Desta forma, esses dados indicam que baixos níveis de IL-10 durante o desenvolvimento da doença podem estar relacionados com uma resposta imune crônica e não protetora que culmina com a manifestação da hanseníase (PEREIRA et. al., 2009).

A MBL reconhece PAMPs como domínios de manose, N-acetilglucosamina, fucose e glicose presentes na superfície de diversos microorganismos e esse reconhecimento possibilita a fagocitose e a posterior ativação do complemento (DORNELLES et al., 2006). Bonar e colaboradores (2005) demonstraram que a via da MBL facilita a entrada das micobactérias nos macrófagos. Em outro estudo foi observada uma associação negativa entre baixas concentrações da proteína MBL e a hanseníase, sugerindo que concentrações reduzidas dessa proteína possuem um papel protetor no desenvolvimento da forma clínica virchowiana de hanseníase (DORNELLES et al., 2006). O papel dos polimorfismos do gene *MBL-2* em pacientes com hanseníase foi investigado e os resultados indicaram que a frequência do haplótipo *LYPA*, associado com uma maior expressão da proteína MBL, foi significativamente maior em pacientes com hanseníase *per se* (OR = 2.25 [IC95% = 1,31–3,88], P = 0,003) e com a forma clínica virchowiana (OR = 2,2 [IC95% = 1,21–4,05] P= 0,008), quando comparados com controles saudáveis (MESSIAS-REASON et al., 2007). Em outro estudo, o alelo *161G>A* do gene *MBL* foi associado com a proteção à forma virchowiana da hanseníase (SAPKOTA et al., 2010).

Contraditoriamente, Vasconcelos e colaboradores (2011) não encontraram diferença significativa na frequência dos genótipos e haplótipos variantes do gene *MBL2* em pacientes brasileiros (Recife, Pernambuco) com hanseníase e indivíduos saudáveis. Entretanto, os autores observaram uma variação dos níveis de MBL em relação a idade, pacientes com mais de 40 anos apresentaram maior expressão dessa proteína quando comparados com pacientes mais jovens.

Boldt e colaboradores (2013a) demonstraram que a frequência da variante *p.126L*, associada com baixas concentrações de MASP2, uma serina protease associada a MBL, foi significativamente maior em pacientes com hanseníase (P=0,00002, OR = 4,92). Os autores concluíram que baixos níveis de MASP2 aumentam a suscetibilidade à hanseníase *per se* e particularmente à forma clínica virchowiana.

Estudos demonstraram associação entre as ficolinas-1 e -2 e hanseníase. Messias-Reason e colaboradores (2009) observaram que a frequência do haplótipo AGA do gene *FCN2* da ficolina-2 foi significativamente menor quando comparado com pacientes com hanseníase *per se* (OR=0,13 [95%IC=0,03-0,43], P<0,001), indicando um efeito protetor à doença. Estudo semelhante foi realizado em amostras de 527 pacientes com hanseníase e 583 controles na China, no promotor e no exon

8 do gene *FCN2*. Os polimorfismos rs3811140 (-557A/G) e rs7851696 (c.772G>T) foram significativamente associados com suscetibilidade à hanseníase e suas diferentes formas clínicas (ZHANG et al., 2013). Estudos de avaliação dos polimorfismos no promotor do gene *FCN1*, foram realizados em amostras de brasileiros e dinamarqueses. Foram pesquisados 10 haplótipos, dos quais foram encontradas associações positivas com os haplótipos *FCN1*3C1*, com um efeito protetor contra a hanseníase em euro-brasileiros, do alelo -399A em afro-brasileiros e uma associação negativa do haplótipo *FCN1*3A* em relação às formas mais severas da doença (BOLDT et al., 2013b).

Uma extensa análise genômica foi realizada com 86 famílias vietnamitas para avaliação de suscetibilidade a hanseníase e os autores encontraram uma ligação entre a suscetibilidade a hanseníase e o cromossomo 6 (q25-27) (MIRA et al., 2003). Posteriormente, essa região foi avaliada utilizando um intervalo de aproximadamente 80 Kb, onde encontrou-se uma associação significativa entre a hanseníase e 17 SNPs pesquisados em amostras vietnamitas e brasileiras, localizados em região compartilhada *PARK2/PACRG* (MIRA et al., 2004).

O gene *PARK2* (*parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase*) codifica a proteína parkina, uma E3-ligase de ubiquitina, que possui um papel importante na degradação de proteínas pelo proteassomo (GIASSON; LEE, 2001). A função do gene *PACRG* (*PARK2 co-regulated*) ainda não está totalmente esclarecida, mas o seu produto é um complexo de chaperonas contendo proteínas de choque térmico (*heat shock*) e chaperoninas chamado Glup/*PACRG* e também relacionado ao sistema de degradação proteassomal (IMAI et al., 2003).

A relação dos genes *PARK2* e *PACRG* com a suscetibilidade a hanseníase foi demonstrada em duas amostras de populações geograficamente distintas (MIRA et al., 2004). Entretanto, essa relação não foi observada em outras populações (MALHOTRA et al., 2006; LI et al., 2012). A possibilidade do envolvimento de outras razões e uma estrutura de desequilíbrio de ligação (DL) diferente entre as populações foi avaliada. A comparação entre diferentes intervalos (*bins*) com base na distância entre os SNPs em populações vietnamitas e indianas indicou diferenças significativas e pode explicar a não replicação das regiões genômicas avaliadas entre as diferentes populações (CHOPRA et al., 2013).

Um trabalho mais recente investigando os efeitos epistáticos da presença dos alelos de risco do gene *PARK2* e dos genes de diversas citocinas inflamatórias

e anti-inflamatórias indicaram um risco aditivo de suscetibilidade ou proteção à hanseníase (CHOPRA et al., 2014). Essa análise de interação permite propor que o fundo genético da hanseníase é complexo e predominante para o desenvolvimento da doença.

2.6 ASSOCIAÇÃO DA HANSENÍASE E COINFECÇÃO COM HEPATITE B

As hepatites virais são um grave problema de saúde pública mundial, uma vez que provocam hepatopatias agudas e crônicas e causam a morte de cerca de 1,4 milhões de pessoas a cada ano. As hepatites virais são um grupo de doenças infecciosas que podem ser transmitidas por via oral-fecal (hepatites A e E), e parenteral-sexual (hepatites B, C e D). A transmissão sexual do vírus da hepatite C é pouco frequente (< 1%) (OMS, 2015; BRASIL, 2008).

A hepatite B é uma pandemia que causa a morte de cerca de 780.000 pessoas a cada ano. Estima-se que 240 milhões de pessoas no mundo têm hepatite B crônica, das quais 650.000 morrem anualmente (OMS, 2015). Importante salientar que a vacina para hepatite B é eficaz em 95% dos indivíduos e segura, o que caracteriza a imunização como uma excelente estratégia para evitar a infecção. Considerando esta estratégia, a faixa de imunização para hepatite B em homens e mulheres foi ampliada para 0 a 49 anos em 2013 (BRASIL, 2013).

O vírus causador da hepatite B (HBV) circula no soro de pacientes infectados na forma de uma partícula de 42 nm, com um envelope externo contendo o antígeno de superfície (HBsAg) e um nucleocapsídeo interno contendo os antígenos do core (HBcAg) e o HBeAg (OMS, 2015).

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo HBV pode ser realizado pela pesquisa dos marcadores sorológicos e de biologia molecular. O primeiro marcador sorológico que aparece entre 30 e 45 dias após o início da infecção é o HBsAg. Logo após aparece o HBeAg, marcador de replicação viral, que permanece por cerca de 10 semanas no soro do paciente. Em seguida, pode ser detectado o anticorpo anti-HBc IgM, marcador de fase aguda da doença, que persiste por até 32 semanas. O anti-HBc total detecta a presença de IgM, marcador de fase aguda, e IgG, marcador que indica contato prévio com o HBV, também presente em infecções

crônicas. O último anticorpo detectado é o anti-HBs, que é o único marcador que confere imunidade ao HBV. O anti-HBs é o único marcador encontrado em indivíduos imunizados, diferente dos indivíduos com infecção prévia, que apresentam anti-HBc total e anti-HBs (Figura 8) (BRASIL, 2007; OMS, 2015).

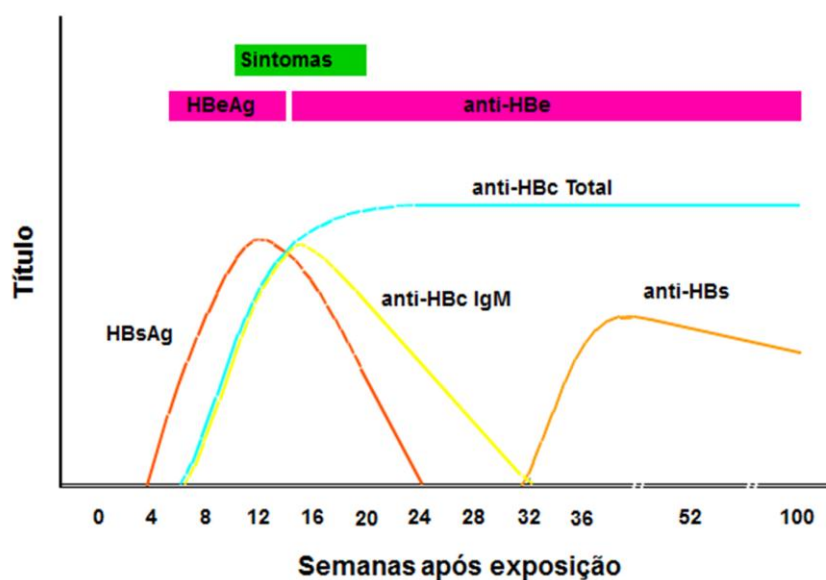


FIGURA 8 – CURSO SOROLÓGICO TÍPICO DA HEPATITE B

LEGENDA: HBsAg = antígeno de superfície do HBV; HBeAg = antígeno “e” do HBV; anti-HBe = anticorpos contra o HBe; anti-HBc total = anticorpos IgM e IgG contra o antígeno do core do HBV (HBc); anti-HBc IgM = anticorpos IgM contra o HBc; anti-HBs = anticorpos contra o HBsAg.

FONTE: Center for Disease Control and Prevention – CDC. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/hepatitis/HBV/index.htm> >

Estudos demonstraram que pacientes com hanseníase são mais suscetíveis à infecção pelos vírus das hepatites B e C (HCV). Foi demonstrada uma forte associação em pacientes com hanseníase e aumento do risco de infecção pelo HCV (OR = 14,95 [95% CI = 1,76–127,03], P=0,004) (BRAGA et al, 2006). Leitão e colaboradores (2014) encontraram uma forte associação da hanseníase, especialmente na forma virchowiana e coinfeção pelo HBV em pacientes de Curitiba (OR=2,4 [95%IC=1,2-4,8], P=0,017).

2.7 SISTEMA COMPLEMENTO

Há mais de 100 anos, o termo complemento foi usado para descrever uma substância que causava lise em bactérias e eritrócitos revestidos com anticorpo e complementava a sua ação. Atualmente, sabe-se que o sistema do complemento (SC) é composto por mais de 35 proteínas séricas e ligadas à membrana celular, as quais são essenciais na imunidade inata e que participam também na imunidade adaptativa. As proteínas do complemento têm um papel importante no controle de infecções bacterianas e virais e na ativação da resposta inflamatória nos locais de injúria tecidual e de deposição de restos celulares e imunocomplexos. O SC atua como um guardião do sistema imune, essencial para a eliminação dos patógenos, complexos imunes, células apoptóticas e debris celulares (PETTIGREW et al., 2009; LISZESWSKI; ATKINSON, 2010).

2.7.1. Vias de ativação do sistema complemento

As proteínas do complemento estão amplamente distribuídas através dos fluidos corporais e dos tecidos na forma de pré-enzimas que são ativadas em cascata desencadeando suas ações. A cascata do complemento pode ser ativada por três vias: (1) via clássica, principalmente através dos anticorpos; (2) via alternativa, através da ligação direta de C3 hidrolisado (C3b) aos patógenos e; (3) via das lectinas, ativada pela lectina ligante de manose (MBL), por ficolinas e colectinas 10 e 11 (CL-K1 ou colectina renal 1 e CL-L1 ou colectina hepática 1, respectivamente). Nesta última via de ativação do complemento, as proteínas MBL, ficolinas e colectinas formam complexos com serinas proteases associadas à MBL (MASP-1 e MASP-2), ativando-as. A MASP-2 ativada leva a formação de C3 convertase da via das lectinas, dependente de MASP-1. As três vias de ativação do complemento convergem para a síntese da enzima C3 convertase que cliva a proteína C3 em C3a, que ativa a resposta inflamatória, e C3b, que se liga covalentemente aos patógenos (opsonização), facilitando a fagocitose pelos macrófagos e neutrófilos. O C3b pode se ligar a outras proteínas do complemento

formando a enzima C5 convertase a qual cliva C5 em C5a (inflamação) e C5b que se fixa na membrana celular. O C5b inicia a formação do complexo de ataque à membrana (C5-C9), que forma poros na membrana celular e leva à lise osmótica (Figura 9) (ABBAS et al., 2008; MURPHY et al., 2010; BELTRAME et al., 2015b).

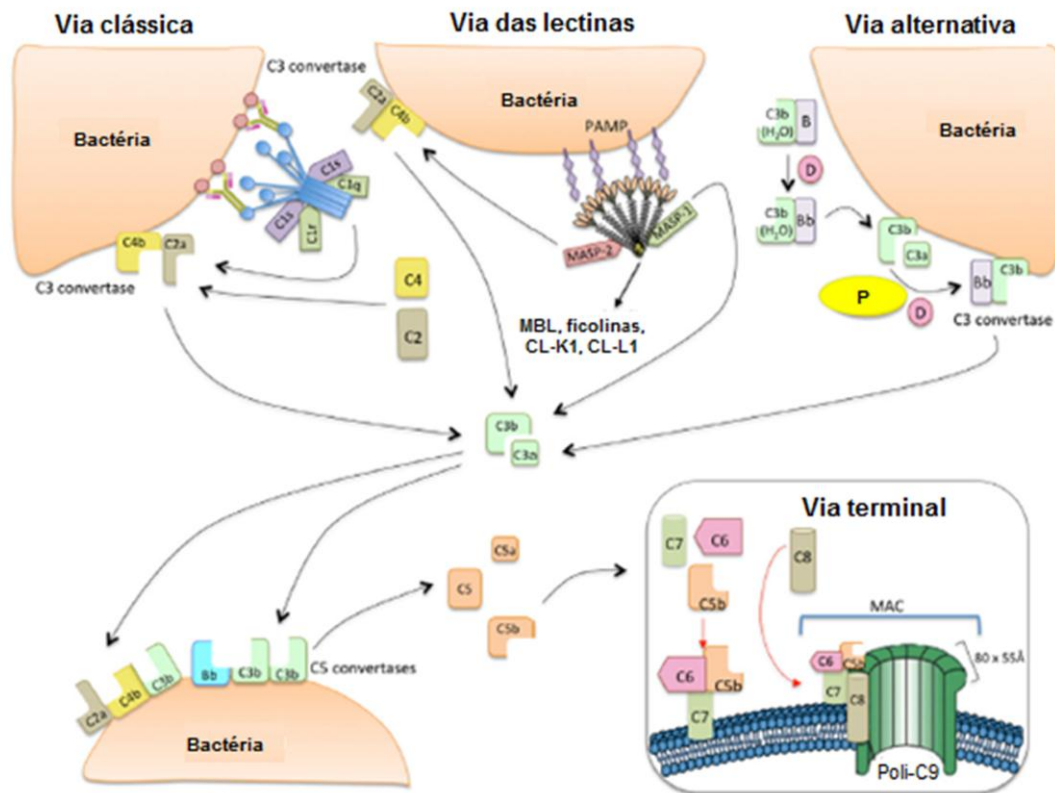


FIGURA 9 - VIAS DE ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO

LEGENDA: MAC (complexo ataque a membrana); MBL (lectina ligante de manose); MASP (serina-proteases associada às MBL); CL-K1 = coletina renal 1; CL-L1 = coletina hepática 1; Poli-C9 = polímero de C9; P = properdina.

NOTA: Via terminal = etapa final da ativação do complemento com formação do MAC e levando à lise osmótica do patógeno.

FONTE: BELTRAME et al., 2015b.

2.7.2 Ficolinas

Ficolinas são proteínas oligoméricas pertencentes ao sistema imune inato que reconhecem PAMPs e quando associadas com as proteínas MASPs ativam o sistema complemento pela via das lectinas ligantes de manose. Foram descritas três

ficolinas em humanos, ficolina-1 ou M, ficolina-2 ou L e ficolina-3 ou H (THIELENS et al., 2007). As ficolinas estimulam os macrófagos a produzir IL-17, IL-6, TNF- α , IFN- γ , e óxido nítrico (NO) limitando o processo infeccioso (REN et al., 2014).

A ficolina-1 (FCN1) é codificada pelo gene *FCN1*, localizado no cromossomo 9q34. A FCN1 pode ser encontrada ligada à membrana celular ou livre no plasma, com concentrações variando de 0,05-1,0 $\mu\text{g/mL}$. A FCN1 também pode ser detectada em grânulos secretados por monócitos, neutrófilos e células epiteliais alveolares tipo II. A FCN-1 reconhece compostos acetilados ligando-se a micro-organismos gram positivos e negativos, tem ação anti-inflamatória, promove a remoção de células próprias alteradas e modula a produção de IL-8 (BELTRAME et al., 2015a).

A ficolina-2 (FCN2) é uma proteína plasmática produzida principalmente no fígado com concentrações variando entre 1-12 $\mu\text{g/mL}$. A FCN2 liga-se a moléculas N-acetilados, ácido N-acetil-neuramínico presente em *Streptococcus agalactiae*, peptidoglicano e glicoproteínas do envelope do vírus da hepatite C. A FCN pode se ligar ao *Mycobacterium bovis*, *Giardia intestinalis* e *Trypanosoma cruzi* e interage com a proteína C reativa, estabilizando-a quando ligada às bactérias. O gene *FCN2* está localizado no cromossomo 9q34 e contém nove exons. Baixas concentrações da ficolina-2 têm sido associadas a infecções respiratórias e bronquiectasia (BELTRAME et al., 2015a).

A ficolina-3 (FCN3) é a mais abundante no plasma com concentrações médias de 18,4 $\mu\text{g/mL}$. A FCN3 foi encontrada no pulmão e fígado, sendo considerada como uma proteína com importante papel na imunidade inata local e sistêmica. A FCN3 reconhece moléculas acetiladas presentes em *Salmonella typhimurium*, *Salmonella minnesota*, *Escherichia coli* e *Aerococcus viridans*. O gene *FCN3* está localizado no cromossomo 1p36.11 (BELTRAME et al., 2015a).

2.7.3. Receptores do complemento

A fagocitose dos patógenos depende primariamente da presença de receptores presentes na superfície da membrana dos fagócitos, os receptores para região Fc de imunoglobulinas (Ig) e os receptores do complemento que reconhecem

fragmentos de C3. Na ausência de anticorpos, o revestimento de partículas ou células próprias ou estranhas com fragmentos de C3 é determinante para o seu reconhecimento pelos fagócitos através de receptores específicos do complemento (CAMPAGNE et al., 2007; GORGANI et al., 2008).

Quatro receptores para fragmentos do complemento foram descritos: CR1 (CD35), CR2 (CD21), CR3 (CD11b/CD18) e CR4 (CD11c/CD18). CR1 está presente em monócitos, macrófagos, neutrófilos e eritrócitos e reconhece o fragmento C3b. CR2 está presente nos linfócitos B e reconhece os fragmentos iC3b e C3d(g). CR3 e CR4, presentes nos monócitos, macrófagos, neutrófilos, células NK e nas células dendríticas (somente CR4), são heterodímeros transmembranares que reconhecem o fragmento iC3b (HE et al., 2008).

Recentemente, foi descrito um novo receptor de complemento da superfamília das imunoglobulinas (HELMY et al., 2006), denominado CR1g.

2.7.4 Receptor de Complemento da Superfamília das Imunoglobulinas (CR1g)

CR1g é uma proteína transmembranar presente nos macrófagos, que reconhece os fragmentos C3b, iC3b e C3c do complemento (Figura 10) (WIESMANN et al., 2006; HE et al., 2006).

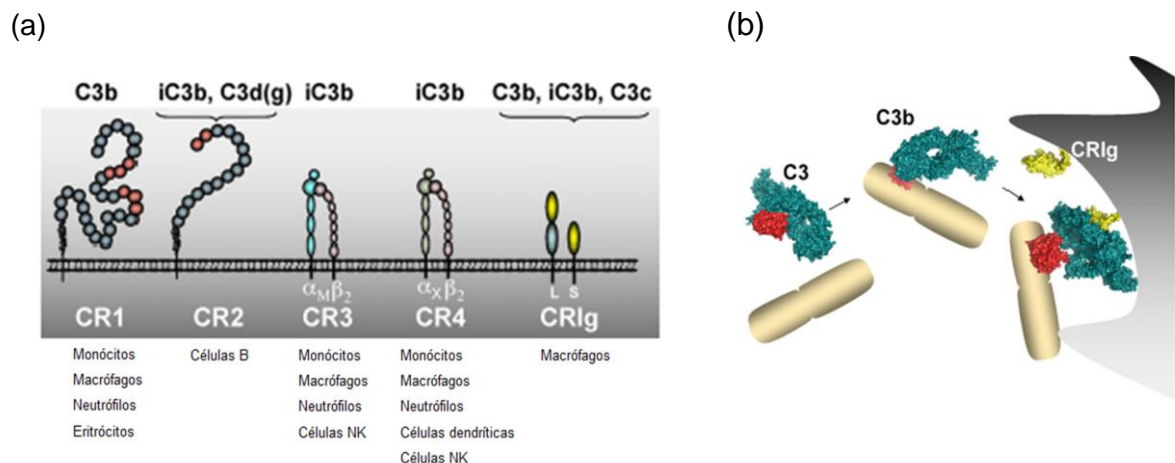


FIGURA 10 – (a) RECEPTORES DO SISTEMA COMPLEMENTO E (b) OPSONIZAÇÃO MEDIADA POR C3b COM RECONHECIMENTO POR CR1g

LEGENDA: C3b, iC3b, C3d(g), C3c = fragmentos da proteína C3; CR1, CR2, CR3, CR4 = receptores de complemento 1 a 4; CR1g = receptor de complemento da superfamília das imunoglobulinas.

FONTE: Adaptado de HE *et al.*, 2008.

A proteína CRlg é codificada pelo gene *VSIG4*, inicialmente denominado *Z39lg* (LANGNAESE et al., 2000). O gene *VSIG4* está localizado na região pericentromérica do cromossomo X humano (Xq12), com 18,3 Kb e 8 exons. O exon 1 tem 117-182 pb e codifica o peptídeo sinal; o exon 2 tem 357 pb e codifica o domínio extracelular de Ig do tipo V (IgV); o exon 3 alternativo tem 282 pb e codifica o domínio extracelular de Ig do tipo C2 (IgC2); os exons 4 e 5 têm 63 pb e 78 pb, respectivamente, e codificam a região estrutural extracelular; o exon 6 tem 105 pb e codifica para a região transmembranar; e os exons 7 e 8, têm 22 pb e 732-763 pb, respectivamente, e codificam a região intracelular. Estes dois últimos podem ser reunidos num só exon em uma das isoformas, contendo 1123 pb ao total (Figura 11) (LANGNAESE et al., 2000; CUNNINGHAM et al., 2015. Disponível em < http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000155659;r=X:66021738-66040125;t=ENST00000374737 > Acesso em 08/01/2015).

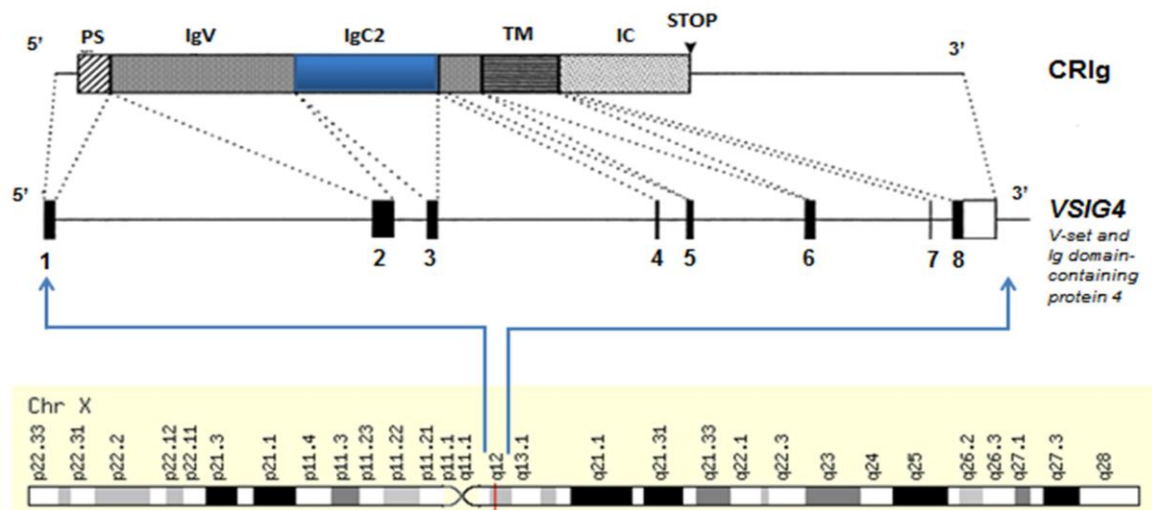


FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA E LOCALIZAÇÃO DO GENE *VSIG4* NO CROMOSSOMO X

LEGENDA: PS= peptídeo sinal; IgV – domínio extracelular de Ig tipo V; IgC2= domínio extracelular de Ig tipo C2; TM – região transmembranar; IC = região intracelular; Chr X= cromossomo X.
FONTE: Adaptado de LANGNAESE et al., 2000.

Helmy e colaboradores (2006) clonaram duas variantes do gene *VSIG4*, uma forma longa idêntica ao *Z39lg*, que codifica uma proteína com 399 aa, com os domínios extracelulares IgV e IgC2, denominada CRlg(L) ou *VSIG4-001*, e uma forma curta que não possui o exon alternativo 3 e codifica uma proteína com 305 aa, com um único domínio extracelular IgV, denominada CRlg(S) ou *VSIG4-003*. As formas longa (IgV e IgC2) e curta (IgV) da proteína CRlg estão presentes em humanos, enquanto camundongos expressam apenas a forma IgV. O

reconhecimento dos fragmentos de C3 e ingestão de partículas opsonizadas ocorre pelo domínio IgV da proteína CRlg. A função do domínio IgC2 ainda não está esclarecida (HELMY et al., 2006; WIESMANN et al., 2006; HE et al., 2008). Posteriormente, foi descrita uma variante denominada *VSIG4-201*, que difere na região 3' UTR e na região codificadora 3', comparada com a variante *VSIG4-001*. A variante *VSIG4-201* se caracteriza pela não tradução do exon 8, o que resulta na síntese de uma isoforma de CRlg com 321 aa com uma região C-terminal mais curta em relação à isoforma *VSIG4-001* (Figura 12) (CUNNINGHAM et al., 2015).

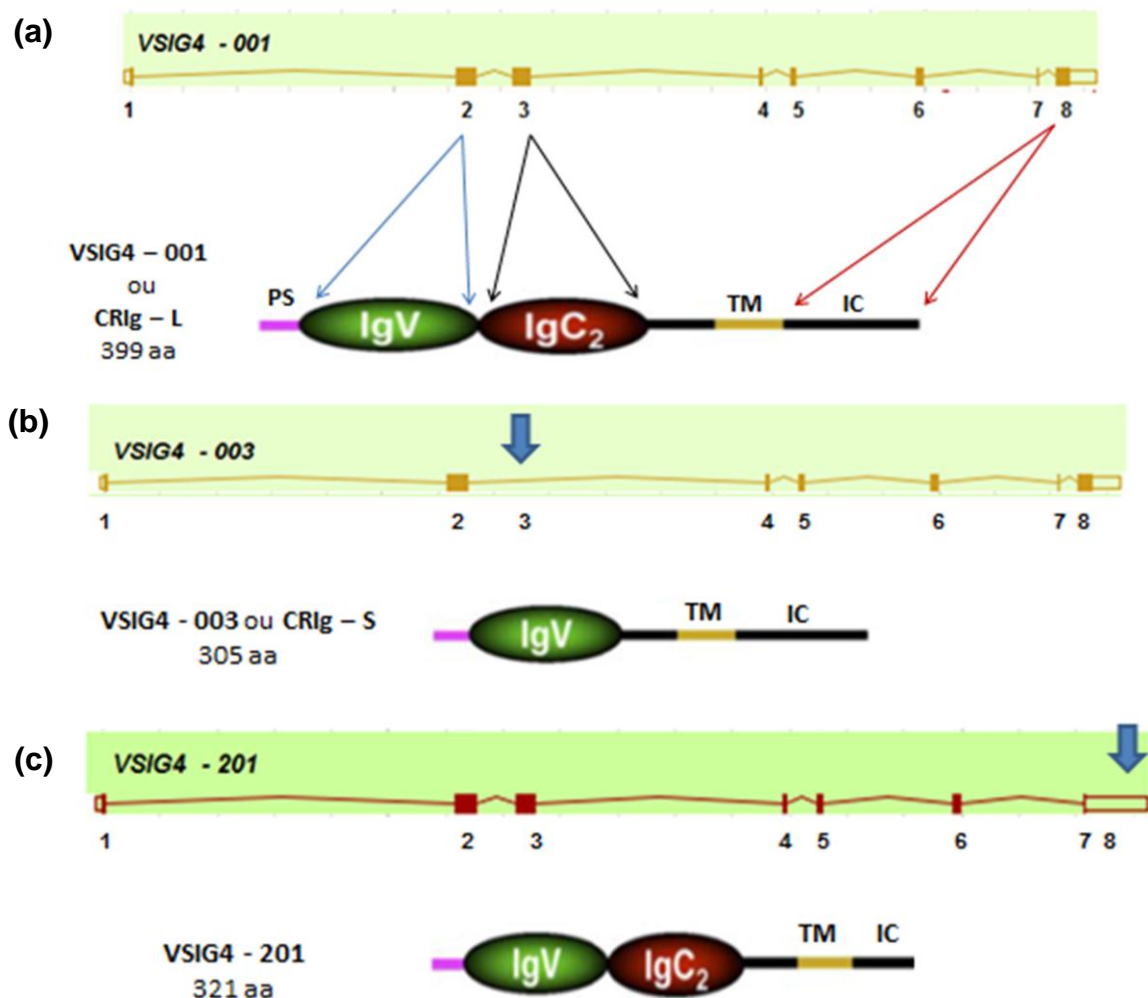


FIGURA 12 – TRANSCRITOS DO GENE *VSIG4* E ISOFORMAS (a) *VSIG4 001*, (b) *VSIG4-003* e (c) *VSIG4-201*.

NOTA: *VSIG4 - 001*: variante contendo 8 exons, codifica a isoforma CRlg(L) com 399 aa; *VSIG4 - 003* = ausência do exon 3 alternativo (seta azul), codifica a isoforma CRlg(S) com 305 aa; *VSIG4 - 201* = codifica uma proteína com 321 aa devido a uma cadeia polipeptídica com a região C-terminal mais curta (exon 8 não traduzido, seta azul).

LEGENDA: PS= peptídeo sinal; IgV – domínio extracelular de imunoglobulina (Ig) tipo V; IgC₂= domínio extracelular de Ig tipo C2; TM – região transmembranar; IC = região intracelular.

FONTE: Adaptado de HELMY et al., 2006; CUNNINGHAM et al., 2015.

CRlg é expresso em altas concentrações em macrófagos do fígado (células de Kupfer - KC), células dendríticas, neutrófilos e macrófagos residentes em vários tecidos (VOGT et al., 2006). Em humanos a proteína CRlg também foi detectada em macrófagos sinoviais, alveolares, da glândula adrenal, coração, baço, células de Hofbauer e histiócitos da lâmina própria (HELMY et al., 2006; VOGT et al., 2006). CRlg é expresso em baixas concentrações nos linfonodos (VOGT et al., 2006) e está ausente em células de Langherhans, células microgliais e macrófagos derivados da medula óssea (HELMY et al., 2006). O gene *VSIG4* é expresso em diversos tecidos. As concentrações mais elevadas de RNA mensageiro (mRNA) foram encontradas no tecido adiposo, pulmão, baço, artérias adrenal e aorta, glândula adrenal esôfago, intestino delgado, nervo torácico, bexiga, colón e sangue total (Figura 13) (LONSDALE et al., 2013).

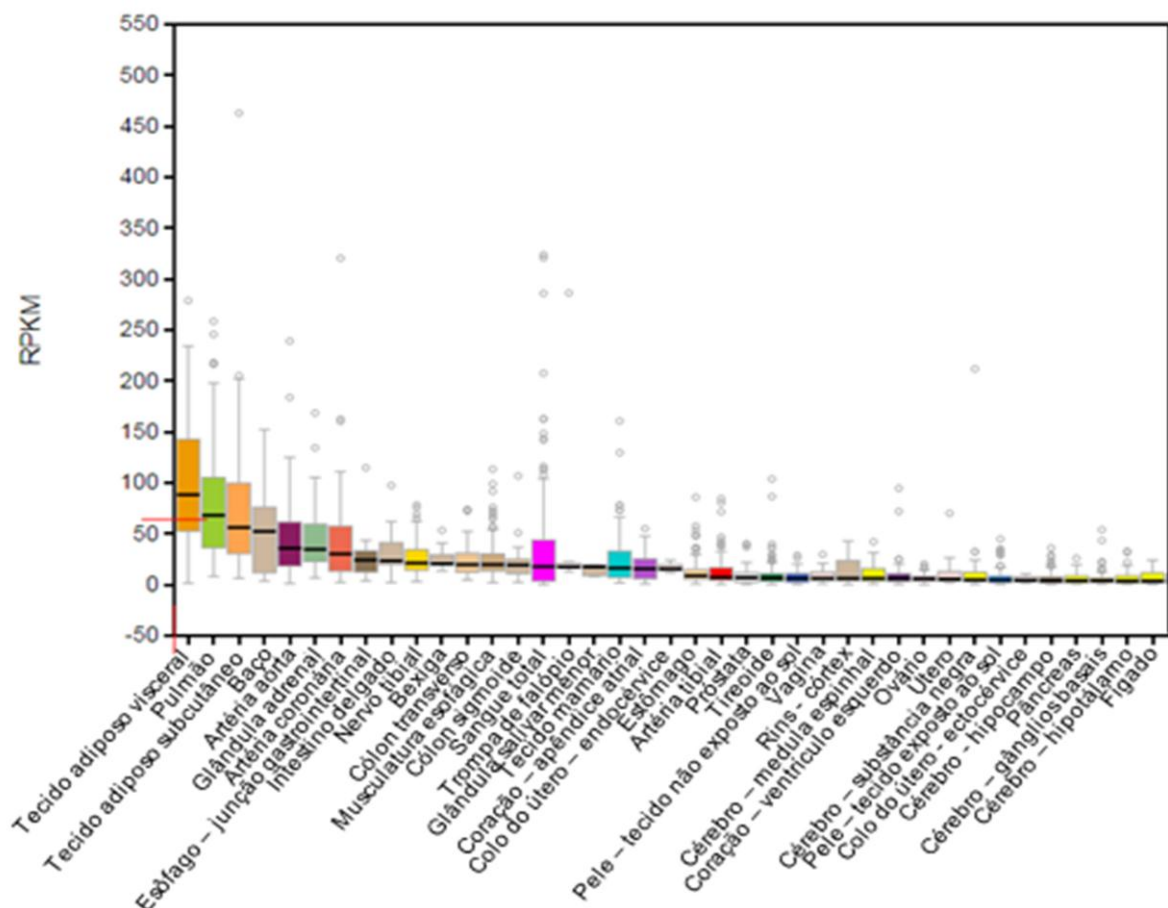


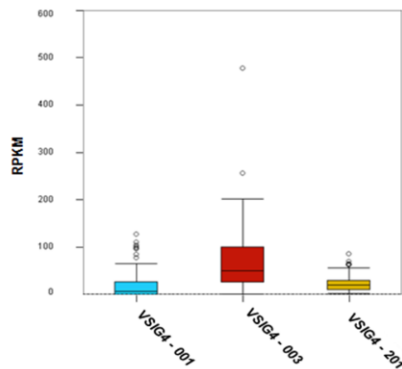
FIGURA 13 – QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *VSIG4* EM DIVERSOS TECIDOS

NOTA: RPKM (*Reads per kilobase per million mapped reads*) é um método para quantificar a expressão de genes a partir de dados do sequenciamento do RNA.

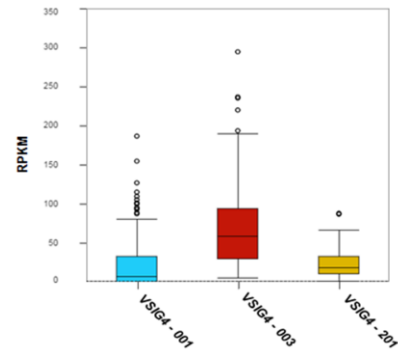
FONTE: LONSDALE et al., 2013.

A isoforma *VSIG4-003* é a variante expressa em maior quantidade na maioria dos tecidos, como o tecido adiposo, pulmão, baço, pele e nervo tibial. No sangue total, são expressas concentrações similares das isoformas *VSIG4-001* e *VSIG4-003* e, em menor quantidade a isoforma *VSIG4-201* (figura 14) (LONSDALE et al., 2013).

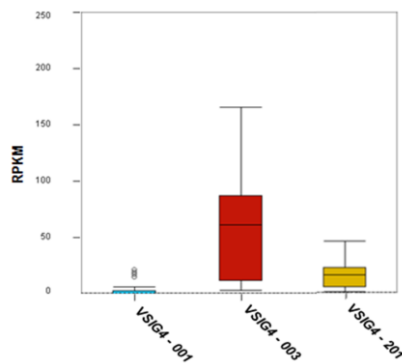
(a) Tecido adiposo



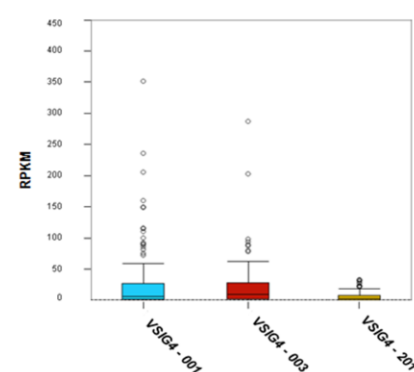
(b) Pulmão



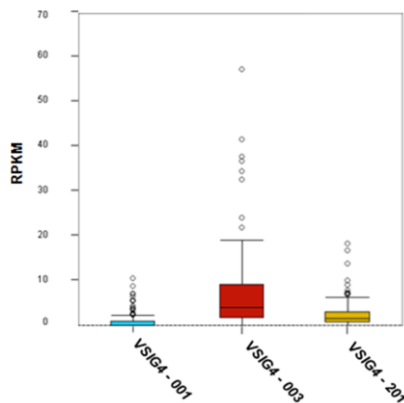
(c) Baço



(d) Sangue total



(e) Pele não exposta ao sol



(f) Nervo tibial

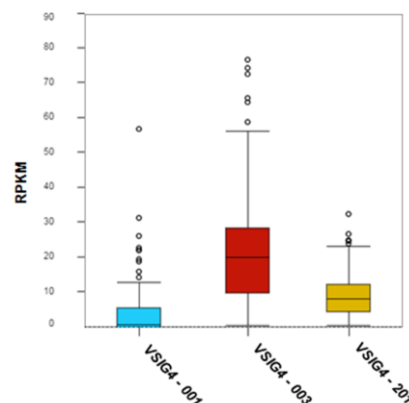


FIGURA 14 – EXPRESSÃO DAS ISOFORMAS DO GENE *VSIG4* NO (a) TECIDO ADIPOSITO, (b) PULMÃO, (c) BAÇO, (d) SANGUE TOTAL, (e) PELE NÃO EXPOSTA AO SOL e (f) NERVO TIBIAL

NOTAS: RPKM (*Reads per kilobase per million mapped reads*) é um método para quantificar a expressão de genes a partir de dados do sequenciamento do RNA.

FONTE: Adaptado de LONSDALE et al., 2013.

A expressão da proteína CRlg em tecidos e na forma livre foi estimada por modelos estatísticos. As concentrações mais elevadas de CRlg foram estimadas no plasma, plaquetas, líquido cefalorraquidiano e suco pancreático (Figura 15).

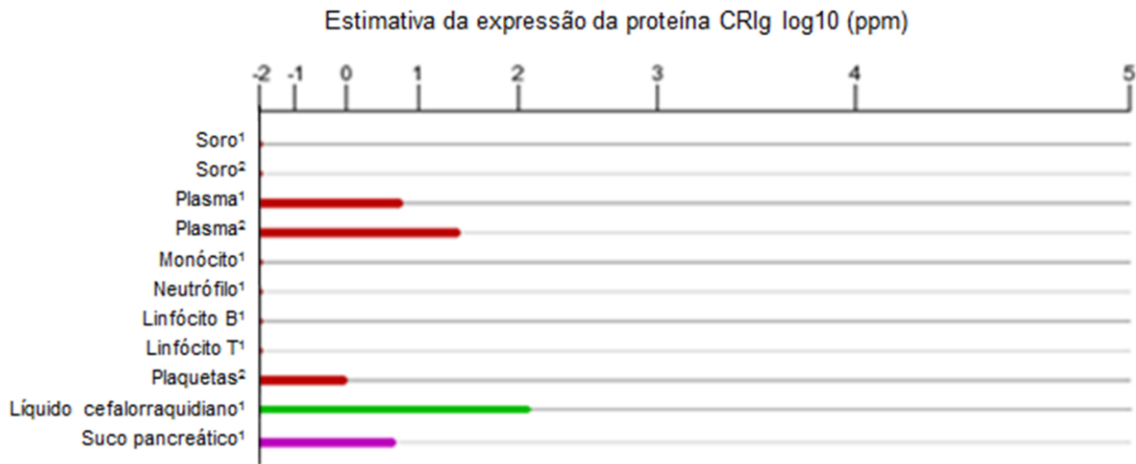


FIGURA 15 – ESTIMATIVA DA EXPRESSÃO DE CRlg

LEGENDA: 1= Estimado por MODEP, Eugene Kolker, Bioinformatics & High-throughput Analysis Lab, Seattle Children's Research Institute.; 2 = Estimado por PaxD, Christian von Mering, Bioinformatics Group, Institute of Molecular Life Sciences, University of Zurich..

FONTE: Estimativa da expressão da proteína CRlg. Disponível em: <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=VSIG4&search=f1e0cb1dc9a95393322ee2527ee7de74>>.

A rápida captura dos patógenos pelo fígado é crucial para evitar bacteremia sistêmica e envolve mecanismos da imunidade inata e adaptativa (ROOZENDALL; CARROLL, 2006). O CRlg parece contribuir para a eliminação de patógenos nos estágios iniciais da infecção através da sua captura pelas KCs. Experimentos com camundongos deficientes de CRlg demonstraram uma incompleta eliminação dos patógenos opsonizados com C3 da circulação, resultando em aumento da infecção e mortalidade (HELMY et al., 2006). Kim e colaboradores (2013) demonstraram que a interação do domínio intracelular do CRlg com o canal intracelular 3 de cloretos (CLIC3) é essencial para a eliminação de bactérias intracelulares. Além disso, o CRlg é um receptor de complemento não somente para patógenos opsonizados, mas também para células autólogas opsonizadas, sugerindo uma via potencial na prevenção da autoimunidade sistêmica. Estudos em camundongos demonstraram que CRlg participa na eliminação de plaquetas opsonizadas com complemento (KIM et al., 2008).

O domínio extracelular IgV de CRlg é um potente inibidor das convertases da via alternativa (VA) do complemento, indicando um potencial uso terapêutico deste receptor (WIESMANN et al., 2006; HE et al., 2008). Experiências em modelos animais com artrite, demonstraram que CRlg na forma solúvel foi capaz de reverter a inflamação e perda óssea pela inibição da VA (KATSCHKE JR et al., 2007).

Macrófagos em tecidos inflamados não expressam CRlg, e a presença de macrófagos teciduais CRlg+, sugere homeostasia e resolução do processo inflamatório (VOGT et al. 2006; HE et al., 2008). O que intriga é o fato de que o CRlg tem um papel essencial na rápida eliminação de bactérias no início da infecção sem induzir um processo inflamatório (CAMPAGNE et al., 2007).

Adicionalmente, CRlg previne a proliferação e ativação dos linfócitos T CD4+ e CD8+ em tecidos intactos, e inibe a produção de interleucina 2 (IL-2). A injeção da proteína CRlg na forma solúvel diminui a resposta antígeno-específica das células T CD8+ e a síntese do IFN- γ , e também reduz a resposta de IgG dependente de células T (VOGT et al., 2006; ZANG; ALLISON, 2006). Resultados similares foram encontrados em outro estudo que utilizou células 293FT transfectadas com *VSIG4*. Foi observado inibição das células CD4+, CD8+ e da proliferação das células T, além da diminuição da produção de IL-2 e IFN- γ *in vitro* (LIAO et al., 2014). Estes achados sugerem que CRlg possa estar envolvido na manutenção da tolerância periférica e não-responsividade das células T (VOGT et al., 2006).

O aumento da expressão do gene *VSIG4* tem sido relacionado com algumas doenças. Textoris e colaboradores (2013) analisaram a expressão do *VSIG4* em amostras de sangue de mulheres com gestação normal e pacientes com pré-eclâmpsia em graus diferentes de gravidade. As pacientes com pré-eclâmpsia demonstraram uma maior expressão do gene *VSIG4* em relação ao grupo controle. Desta forma, os autores sugeriram a utilização do *VSIG4* como um potencial marcador de pré-eclâmpsia grave. Outro estudo demonstrou uma elevada expressão de *VSIG4* em fibroblastos infectados com *Borrelia burgdorferii*, a bactéria causadora da doença de Lyme, quando comparados com a cultura controle (GEÇA et al., 2012). Também foi encontrada uma maior expressão do gene *VSIG4* em pacientes pós transplantados, positivos para infecção pelo vírus Epstein Baar - EBV(+) quando comparados com pacientes EBV (-) (MORSCIO et al., 2013).

Sturtz e colaboradores (2014) encontraram um padrão de expressão diferencial no tecido próximo a tumores invasivos de mama, com aumento da

expressão do gene *VS/G4* o que indica um microambiente favorável à tumorigênese. Outro estudo demonstrou que o CRlg é um importante ativador que facilita o desenvolvimento do câncer de pulmão de pequenas células. Foram encontradas grandes quantidades da proteína infiltradas nas amostras e as análises de imunofluorescência indicaram a presença de CRlg em macrófagos CD68+ mas não encontraram em CD3+, CD31+ (células endoteliais) e CK-18+ (células epiteliais) (LIAO et al., 2014).

O aumento da expressão de *VS/G4*/CRlg foi correlacionado com doenças. Entretanto, não foi relatado em literatura associação dos polimorfismos desse gene e suas isoformas com doenças, propiciando um campo de pesquisa a ser explorado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Esse trabalho constituiu-se de um estudo de associação, caso-controle e retrospectivo, realizado no Laboratório de Imunopatologia Molecular do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná - HC/UFPR. O estudo foi realizado após aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR de acordo com os pareceres consubstanciados do nº 218.104 e 279.970 (anexos I e II).

3.1. CASUÍSTICA

3.1.1 Pacientes

As amostras foram obtidas a partir de pacientes com hanseníase, de duas cidades distintas, Curitiba- PR, na Região Sul (Serviço de Dermatologia do HC – UFPR e Centro Regional de Especialidades Metropolitano - CRE METROPOLITANO) e Sinop-MT, na Região Centro-Oeste (Centro de Referência em Hanseníase e Tuberculose da Prefeitura Municipal). Foram coletadas um total de 361 amostras de pacientes com diagnóstico clínico de hanseníase, sendo 191 de Curitiba e Região Metropolitana e 170 de Sinop-MT. Foram incluídos neste estudo indivíduos maiores de 18 anos, com diagnóstico clínico da hanseníase, que apresentaram uma ou mais das seguintes características: lesão(ões) de pele com alteração de sensibilidade, acometimento de nervo(s) com espessamento neural e baciloscopia positiva. Indivíduos sem a forma clínica da hanseníase especificada foram excluídos para fins de análises estatísticas.

3.1.2 Grupo Controle

O grupo controle foi obtido no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná – HEMEPAR e no Centro de Referência em Hanseníase e Tuberculose da Prefeitura Municipal de Sinop-MT. Foram coletadas 289 amostras de indivíduos saudáveis, sendo 177 doadores voluntários de sangue e 121 indivíduos sem hanseníase que cohabitam com pacientes hansenianos. Foram excluídos deste estudo indivíduos menores de 18 anos.

Os controles foram pareados por sexo, idade e grupo étnico com os pacientes incluídos neste trabalho.

3.1.3 Dados demográficos e formas clínicas da hanseníase

A origem étnica dos indivíduos foi definida através do questionamento aberto em relação a sua ascendência e dos aspectos físicos observados em cada indivíduo, como a cor da pele.

Foram incluídos neste estudo 368 indivíduos de Curitiba-PR e 291 indivíduos de Sinop-MT. Os dados demográficos dos indivíduos dos grupos controle e pacientes estão demonstrados na tabela 1.

TABELA 1 - DADOS DEMOGRÁFICOS DOS PACIENTES E CONTROLES

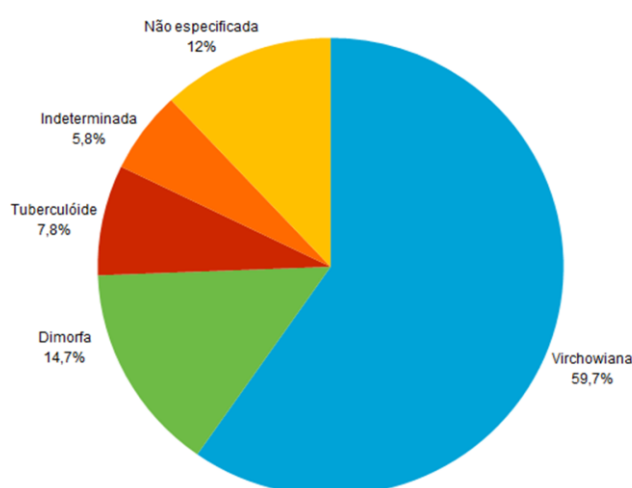
		Curitiba-PR N = 368		Sinop-MT N = 291	
		Grupo controle N = 177 (%)	Pacientes N = 191 (%)	Grupo controle N = 121 (%)	Pacientes N = 170 (%)
Sexo	Masculino	106 (59,9)	117 (61,3)	54 (44,6)	87 (51,2)
	Feminino	71 (40,1)	74 (38,7)	67 (55,4)	83 (48,8)
Idade (Média)		42	51	46	48
Grupo Étnico	Euro-brasileiro	146 (82,5)	157 (82,2)	72 (59,5)	109 (64,1)
	Afro-brasileiro	31 (17,5)	34 (17,8)	48 (39,7)	59 (34,7)
	Oriental	0	0	1 (0,8)	2 (1,2%)

Legenda: N = número de amostras.

Em relação às formas clínicas dos pacientes com hanseníase de Curitiba a maior frequência observada, 59,7% (114/191) foi a forma virchowiana. As frequências observadas das demais formas clínicas foram, 14,7% (28/191) dimorfa, 7,8% (15/191) tuberculoide e 5,8% (11/191) indeterminada. Não foi especificada a forma clínica de 12% (23/191) pacientes (Figura 16).

Em Sinop, a forma clínica observada com a maior frequência, 75,3% (128/170) foi a dimorfa, seguida de, 14,7% (25/170) virchowiana, 7,6% (13/170) tuberculoide e 1,2% (2/170) indeterminada. Não foi especificada a forma clínica de 1,2%(2/170) dos indivíduos (Figura 16).

(a) Curitiba-PR



(b) Sinop-MT

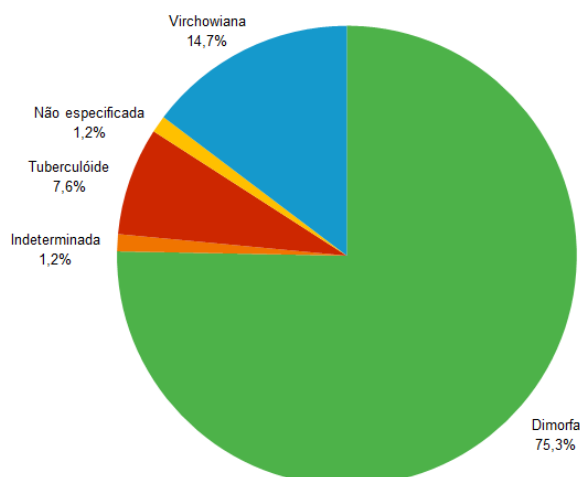


FIGURA 16 - FORMAS CLÍNICAS DOS PACIENTES COM HANSENÍASE DE (a) CURITIBA-PR E (b) SINOP-MT

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Coleta de amostras

As coletas foram realizadas após explanação sobre a pesquisa, esclarecimento de dúvidas e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (anexos III e IV). As amostras foram obtidas pela coleta de 5 mL de sangue venoso periférico em um tubo com anticoagulante etilenodiaminotetracético (EDTA) e 5 mL em um tubo sem anticoagulante. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 1.164G (Centrífuga Eppendorf 5416, Hamburgo, Alemanha). As amostras coletadas sem anticoagulantes foram separadas em três alíquotas de soro, identificadas e armazenadas em freezer a -80°C. As amostras coletadas com EDTA foram separadas em três alíquotas de plasma e uma alíquota da camada leuco-plaquetária (*buffy-coat*), identificadas e armazenadas em freezer a -80°C.

3.2.2 Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído da camada leuco-plaquetária com o *Kit* comercial *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) de acordo com as orientações do fabricante, seguindo as etapas de lise eritrocitária, lise nuclear dos linfócitos, precipitação de proteínas, precipitação e reidratação do DNA.

Em um tubo de microcentrífuga com capacidade para 1,5 mL, adicionou-se 150 µL de *buffy coat* e 600 µL de solução de lise celular. Após homogeneização adicionou-se 12 µL de proteinase K e o tubo foi incubado à temperatura ambiente por 30 minutos. A amostra foi centrifugada a 13.000 x g por 2 minutos. O sobrenadante foi removido. Foram adicionados 300 µL da solução de lise nuclear no tubo que continha as células ressuspensas, a solução foi homogeneizada e incubada a 37°C em estufa por 5 minutos. Foi adicionado 1,5 µL da solução de

RNase na parede do tubo e adicionado 100 µL de solução de precipitação proteica ao lisado nuclear e foi incubado a 37°C por 5 minutos. O tubo foi agitado vigorosamente no agitador *Vortex* seguido de centrifugação a 13.000 x g por 3 minutos a temperatura ambiente. Foi observado um sedimento proteico de coloração marrom escuro. O sobrenadante foi transferido para um tubo de microcentrífuga de 1,5 µL, limpo, previamente preenchido com 300 µL de isopropanol gelado. A solução foi homogeneizada suavemente até que se formassem fios de DNA visíveis e o tubo foi centrifugado a 13.000 x g por 3 minutos. O DNA se torna visível como uma pequena massa no fundo do microtubo. O sobrenadante foi descartado e adicionado etanol 70% a temperatura ambiente. O tubo foi homogeneizado e centrifugado a 13.000 G por 3 minutos. O etanol foi descartado e o tubo foi invertido sobre papel absorvente até a completa evaporação do etanol. Foi adicionado 50 µL de solução de reidratação do DNA. O tubo contendo o DNA extraído foi incubado por 12 horas em geladeira a 4°C.

A concentração das amostras de DNA foi determinada em espectrofotômetro *NanoDrop* 1000 versão 3.7.1 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Massachusetts, EUA) e essas foram armazenadas em freezer a -20°C até a amplificação.

3.2.3 Reação em Cadeia da Polimerase Sequência Específica (PCR-SSP)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica relativamente simples, altamente sensível e permite a rápida amplificação *in vitro* de um seguimento específico de DNA. São produzidas bilhões de cópias de um fragmento específico de DNA. A reação é realizada em sucessivos ciclos de desnaturação da dupla fita de DNA, anelamento e extensão de oligonucleotídeos específicos (iniciadores) pela ação da enzima Taq DNA polimerase (GARIBYAN; AVASHA, 2013).

No método de PCR sequência específica (PCR-SSP) são utilizados iniciadores que consistem de 18 a 25 nucleotídeos desenvolvidos para o último nucleotídeo (5') seja complementar aos nucleotídeos variantes de interesse da fita-molde. A genotipagem SSP baseia-se na premissa de que, se não houver complementaridade perfeita entre o último nucleotídeo do iniciador e a fita-molde,

não há amplificação da sequência desejada, permitindo a genotipagem dos SNPs do gene candidato *VSIG4* na população estudada.

3.2.3.1 PCR-SSP do gene *VSIG4*

A técnica de PCR-SSP foi associada com a PCR *touchdown* para aumentar a especificidade e a sensibilidade, otimizando a reação. A PCR *touchdown* consiste em reduzir a temperatura de anelamento entre os ciclos da PCR partindo de uma temperatura acima da temperatura de pareamento calculada para os iniciadores ($T_{melting}$ ou T_m) (KORBIE; MATTICK, 2008).

Nesse estudo foram analisados seis SNPs do gene *VSIG4*:

Promotor	rs2284705 (g.3697T>A), -1431
	rs5964489 (g.4443G>C), -685
Intron 1	rs5964488 (g.11199A>G), +6069
Exon 2	rs34581041 (g.11562C>T, p.R108W), +6432
Intron 3	rs5964487 (g.15364T>C), +10234
	rs9887348 (g.16029A>G), +10899

O gene *VSIG4* é altamente conservado (99% de homologia entre o cDNA do homem e do chimpanzé (*Pan troglodytes*), com razão dN/dS* de 31,6%, e 88% de homologia entre o cDNA do homem e do sagui de tufo branco (*Callithrix jacchus*), com dN/dS* de 34,8% (CUNNINGHAM et al., 2015. Disponível em < http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Compare_Ortholog?db=core;g=ENSG00000155659;r=X:66021738-66040125> Acesso em 12/05/15).

Por esta razão, selecionou-se SNPs em regiões não codificadoras, não tão conservadas. Dentre estes, selecionamos SNPs que possivelmente alteram regulação da expressão gênica, no promotor. Dentre os dois SNPs selecionados, o

* As razões dN/dS abaixo de 1 (ou 100%) implicam que, em qualquer uma das três posições de um códon do gene, substituições não sinônimas (dN) são menos comuns (no caso de *VSIG4*, muito menos comuns) que as substituições sinônimas (dS), que não alteram o aminoácido na proteína. Este é um forte indício de seleção purificadora, ou seja, substituições de aminoácido não são toleradas no gene, indivíduos com substituições não sinônimas não chegam à idade adulta ou não se reproduzem.

-685 é comum na população europeia (G = 85%, C = 15%). Também selecionou-se SNPs intrônicos comuns na população europeia (intron 1_+6069, A = 85%, G = 15%; intron3_+10234, T = 86%, C = 14%; intron3_+10.899, A = 85%, G = 15%), que possivelmente interferem no processamento alternativo do exon 3 no pré-mRNA, modulando a sua inclusão ou exclusão e gerando, portanto, diferentes isoformas da proteína.

Também selecionou-se um SNP não sinônimo no exon 2 (rs34581041, exon 2_+6432), polimorfo na população africana (C = 99%, T = 1%). Este SNP causa a substituição do aminoácido arginina por triptofano na posição 108 do domínio IgV. da proteína CRlg (R108W)(KUMAR et al., 2009). Embora não hajam estudos funcionais com a proteína alterada, até o momento, é possível que seja deletéria, de acordo com a predição fornecida pelo algoritmo SIFT (SIFT = 0,03; CUNNINGHAM et al., 2015. Disponível em: <http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Mappings?db=core;r=X:66033064-66034064:v=rs34581041:vdb=variation:vf=11065911>. Acesso em 12/05/15), alterando a função da isoforma VSIG4 – 003. Os iniciadores direto e reverso (Tabela 2) foram desenhados de acordo com a sequência do locus do gene *VSIG4* 66.021.738-66.040.125 no cromossomo X, e amplificam fragmentos de 792 pares de base (pb), com os iniciadores que acoplam na região promotora, 412 pb ao intron 1 e exon 2 e 768 pb ao intron 3 (Figuras 17 e 18).

TABELA 2 - SEQUÊNCIA DOS INICIADORES PARA GENOTIPAGEM DO GENE *VSIG4*

Nº	Região	Posição	SNP	Direção	Iniciador	Fragmento (pb)
1	Promotor	-1431	rs2284705	Fwd	5'-TGG TGT AGT GGT GAT AGG GTG T-3'	792
2		-1431			5'-TGG TGT AGT GGT GAT AGG GTG A-3'	
3		-685	rs5964489	Rev	5'-TCA CTT TCT ACA ATG GCT CCA CCT C-3'	
4		-685			5'-TCA CTT TCT ACA ATG GCT CCA CCT G-3'	
5	Intron 1	+6069	rs5964488	Fwd	5'-GTG ATA GAA AGA AAG TTG AGT GGC A-3'	412
6		+6069			5'-GTG ATA GAA AGA AAG TTG AGT GGC G-3'	
7	Exon 2	+6432	rs34581041	Rev	5'-TGA CTT CAC ACG TGT AGT GGC TCC G-3'	
8		+6432			5'-TGA CTT CAC ACG TGT AGT GGC TCC A-3'	
9	Intron 3	+10234	rs5964487	Fwd	5'-CCT CAA ACC TGT TAG AAA ACA T-3'	768
10		+10234			5'-CCT CAA ACC TGT TAG AAA ACA C-3'	
11		+10899	rs9887348	Rev	5'-GAC ATG AGA AAA CCA TAA GCT C-3'	
12		+10899			5'-GAC ATG AGA AAA CCA TAA GCT T-3'	

NOTA: fwd = direto; rev = reverso; A = adenina; T = timina; C = citosina; G = guanina; pb = pares de base.

[illegible]

FIGURA 17 - REGIÕES DO ACOPLAMENTO DOS INICIADORES DA PCR-SSP NO GENE VS/G4

LEGENDA: f – iniciador direto; r – iniciador reverso.

NOTA: As regiões de hibridação de cada iniciador estão em destaque e coloridas.

FONTE: CUNNINGHAM et al., 2015. Disponível em: <http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Sequence?db=core;q=ENSG00000155659;r=X:66021738-66040125;t=ENST00000374737>.

Acesso em 10/04/2015.

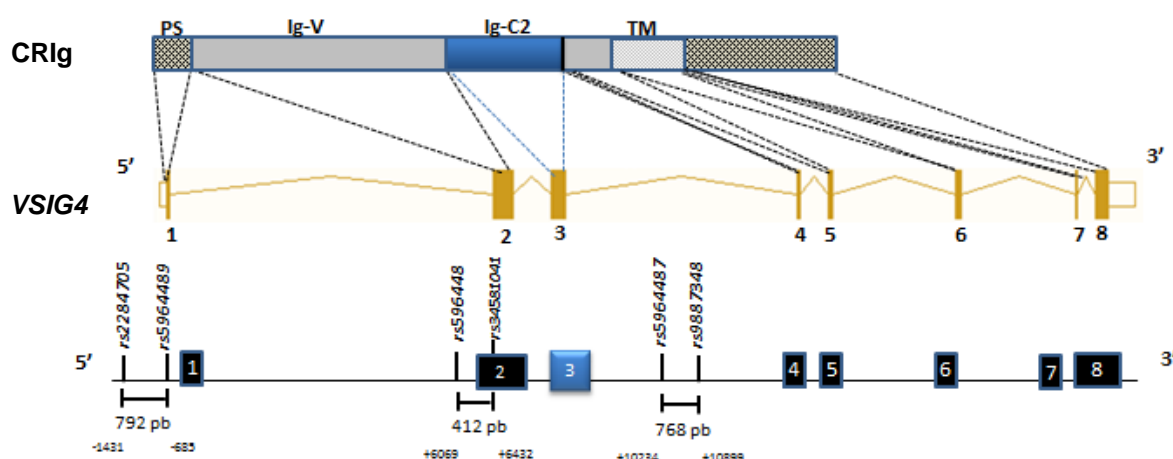


FIGURA 18 - SNPs DO GENE *VSIG4* E PROTEÍNA CRlg

LEGENDA: SP – peptídeo sinal; IgV – domínio extracelular de Ig tipo V; IgC2 – domínio extracelular de Ig tipo C2; TM – região transmembranar.

Para cada reação de PCR utilizou-se de 50 a 100 ng de DNA genômico. A solução de reação foi preparada com tampão coral (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos), glicerol, $MgCl_2$, deoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP), iniciadores (Eurofins MWG Operon, CA, Estados Unidos), Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Para amplificação do alelo G no intron 1_+6069, +6432 foi utilizada a solução Q (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) para aumentar a especificidade da reação.

Para cada amostra foram realizadas quatro reações de PCR-SSP para o promotor, intron1/exon2 e intron3, totalizando 12 reações. A PCR-SSP foi realizada em termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, CA, Estados Unidos) em 30-35 ciclos, temperatura de desnaturação de 94°C por 20 segundos, e temperatura de extensão de 72°C por 30 segundos. Em todas as reações de PCR, foram incluídos controles endógenos, controles positivos e controles negativos que são soluções de reação completas, sem o DNA. Para controle da reação de PCR, foi utilizado um controle endógeno específico, que consiste em um par de iniciadores genéricos, compatíveis com os iniciadores da PCR-SSP, que amplificam uma sequência específica não variável de um gene. O controle endógeno deve amplificar em todas as amostras testadas e nos controles positivos para validar uma reação de PCR. O

controle positivo é constituído de uma amostra com genótipo conhecido, sendo utilizado para controle da genotipagem.

As temperaturas de anelamento foram diferentes para cada reação, com diminuição da temperatura a cada 10-15 ciclos (PCR *touchdown*) para aumentar a especificidade e a sensibilidade, conforme descrito a seguir:

- Promotor_-1431,-685: 10 ciclos a 66°C, 10 ciclos a 64°C, 10 ciclos a 62°C;
- Intron1/Exon2_+6069, +6432: 10 ciclos a 70°C, 15 ciclos a 68°C, 10 ciclos 66°C;
- Intron3_+10234,+10899: 10 ciclos a 65°C, 10 ciclos a 63°C, 15 ciclos a 61°C.

A concentração e o volume dos reagentes utilizados para cada PCR estão listados nas tabelas 3, 4 e 5.

TABELA 3 - CÁLCULOS DA REAÇÃO DE PCR-SSP PARA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO - 1431, -685 DO PROMOTOR DO GENE *VSIG4*

Reagente	[Inicial]	[Final]	Volume (µL)
Tampão coral (x)	10	1	1,5
Glicerol	10%	2,0%	3
MgCl ₂ (mM)	25	0,1	0,06
dNTP (mM)	25	0,2	0,12
Iniciador HGHR	10	0,15	0,225
Iniciador HGHf	10	0,15	0,225
Iniciador VSIG4 Prom_-1431Tf/Af (µM)	10	0,2	0,3
Iniciador VSIG4 Prom_-685Cr/Gr (µM)	10	0,2	0,3
Taq Invitrogen Platinum (U/µl)	5	0,04	0,12
DNA			1
H ₂ O			8,15
Total			15
Produtos esperados:			
VSIG4 Prom_-1431, -685		792 pb	
HGH (controle endógeno)		431 pb	

NOTA: [Inicial] = concentração inicial; [Final] = concentração final; f = direto; r = reverso; HGH = Hormônio do crescimento humano; HGHf = 5' TGCCTTCCCAACCATTCCTTA 3'; HGHR = 5' CCACTCACGGATTCTGTTGTGTTTC 3'.

TABELA 4 - CÁLCULOS DA REAÇÃO DE PCR-SSP PARA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO +6069, +6432 DO INTRON 1 - EXON 2 DO GENE *VS/G4*

(a) Genotipagem para os alelos A (+6069), C e T (+6432)

Reagentes	[Inicial]	[Final]	Volume (µL)
Tampão coral (x)	10	1	1,5
Glicerol (%)	10%	2,5%	3,75
MgCl ₂ (mM)	0	0	0
dNTP (mM)	25	0,2	0,12
Iniciador <i>VS/G4</i> In1_+6069 Af	10	0,7	1,05
Iniciador Ex2_+6432 Cr/Tr	10	0,7	1,05
Iniciador GH1_f	10	0,06	0,09
Iniciador GH1_r	10	0,06	0,09
Taq Invitrogen (U/µL)	5	0,05	0,15
DNA			1
H ₂ O			6,2
Total			15

(b) Genotipagem para os alelos G (+6069) e T (+6432)

Reagentes	[Inicial]	[Final]	Volume (µL)
Tampão coral (x)	10	1	1,5
Glicerol (%)	10%	0,0%	0
MgCl ₂ (mM)	0	0	0
dNTP (mM)	25	0,2	0,12
Iniciador <i>VS/G4</i> In1_+6069Gf	10	0,2	0,3
Iniciador <i>VS/G4</i> Ex2_+6432Tr	10	0,2	0,3
Iniciador GH1_f	10	0,04	0,06
Iniciador GH1_r	10	0,04	0,06
Solução Q	5	0,25	0,75
Taq Invitrogen Platinum (U/µL)	5	0,03	0,09
DNA			1
H ₂ O			10,82
Total			15

Produtos esperados:

GH1 (controle endógeno)	690 pb
<i>VSIG4</i> In1, Ex2_+6069,+6432	412 pb

NOTA: [Inicial] = concentração inicial; [Final] = concentração final; f = direto; r = reverso; *GH1* = Hormônio do crescimento humano; *GH1f* = 5' GTGGTCAGAGCCCCCGGGCAGCACA 3'; *GH1r* = 5' GTCACAGGGATGCCACCCGGGCAGC 3'.

TABELA 5 - CÁLCULOS DA REAÇÃO DE PCR-SSP PARA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO +10234,+10899 DO INTRON 3 DO GENE *VSIG4*

(a) Genotipagem para o alelo T (+10234)

Reagentes	[Inicial]	[Final]	Volume (µL)
Tampão coral (x)	10	1	1,5
Glicerol (%)	10%	2,35%	3,525
MgCl ₂ (mM)	25	0,4	0,24
dNTP (mM)	25	0,2	0,12
Iniciador <i>VSIG4</i> In3_+10234 Tf (µM)	10	1	1,5
Inicador <i>VSIG4</i> In3_+10899 Gr/Ar (µM)	10	1	1,5
Iniciador Promf (MBL)	10	0,125	0,19
Iniciador rev+270 (MBL)	10	0,125	0,19
Taq Invitrogen (U/µL)	5	0,05	0,15
DNA			1
H ₂ O			5,09
Total			15

(b) Genotipagem para o alelo C (+10234)

Reagentes	[Inicial]	[Final]	Volume (µL)
Tampão coral (x)	10	1	1,50
Glicerol (%)	10%	2,35%	3,53
MgCl ₂ (mM)	25	0,4	0,24
dNTP (mM)	25	0,2	0,12
Iniciador <i>VSIG4</i> In3_+10234 Cf (µM)	10	0,5	0,75
Iniciador <i>VSIG4</i> In3_+10899 Gr/Ar (µM)	10	0,5	0,75
Iniciador Promf (MBL)	10	0,125	0,19
Iniciador rev+270 (MBL)	10	0,125	0,00
Taq Invitrogen (U/µL)	5	0,05	0,15
DNA			1,00
H ₂ O			6,78
Total			15
Produtos esperados:			
Prom f -> rev+270 (MBL) (controle endógeno)	1059 pb		
<i>VSIG4</i> In3_+10234, +10899	768 pb		

NOTA: [Inicial] = concentração inicial; [Final] = concentração final; f = direto; r = reverso; MBL = Lectina ligante de Manose; Promf (MBL) = 5' GGCCAACGTAGTAAGAAATTTCCAGAGA 3'; rev+270 (MBL) = 5' GAGGGAGTGATGGAAACAGGGACA 3'.

A análise dos resultados da amplificação foi realizada através de eletroforese em gel de agarose a 1,5%. A interpretação foi baseada no padrão de bandas coradas com corante Sybr®Safe (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, EUA), as

quais são fluorescentes sob luz azul. Os produtos amplificados foram comparados com marcador de peso molecular de 100 pb (KASVI, Curitiba, Paraná, Brasil).

Os padrões eletroforéticos da PCR-SSP para o gene *VSIG4* estão demonstrados na figura 19.

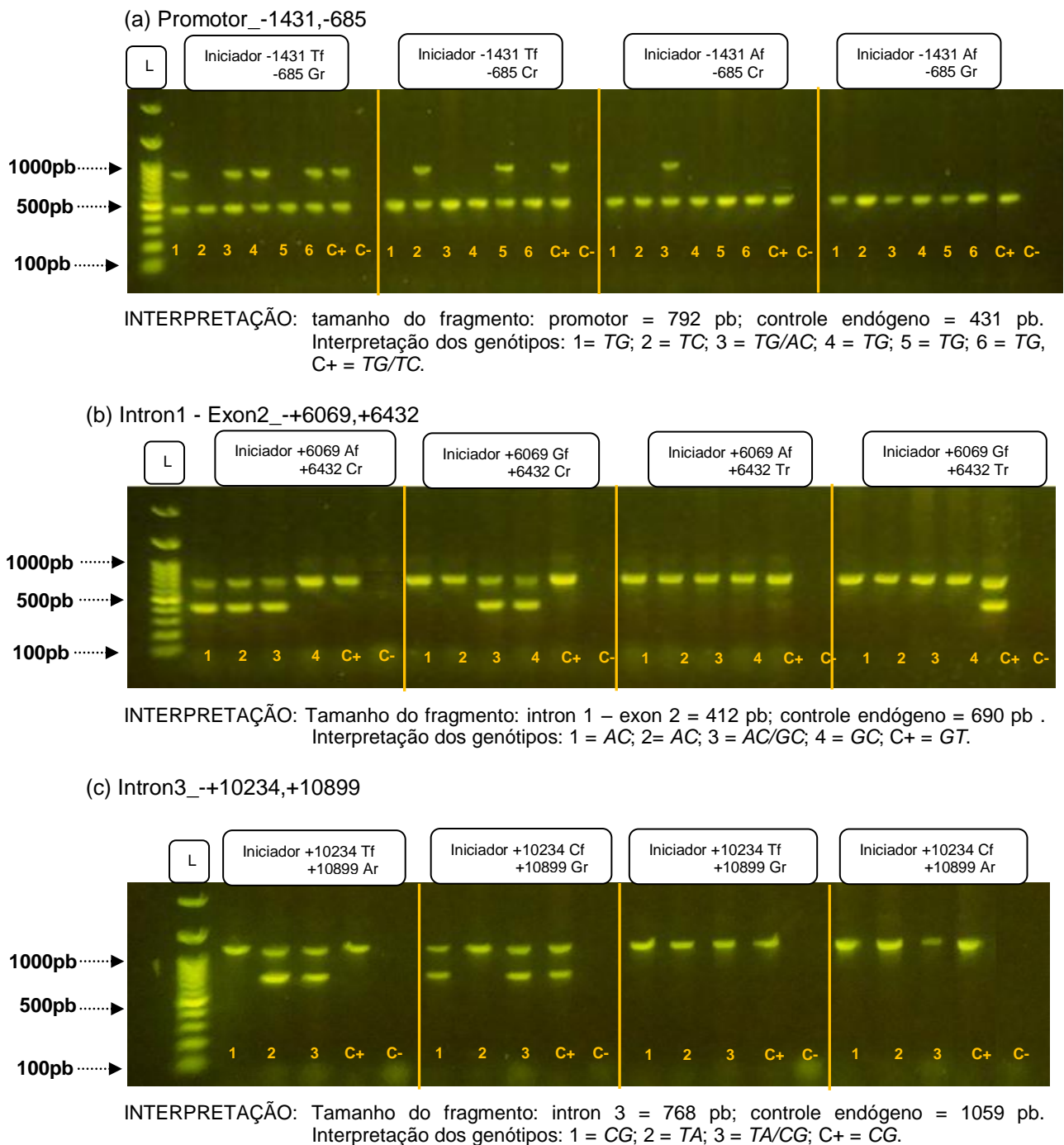


FIGURA 19 - PADRÃO ELETROFORÉTICO DA PCR-SSP REALIZADA PARA O GENE *VSIG4*

LEGENDA: C+, controle positivo; C-, controle negativo; f, iniciador direto; r, iniciador reverso; L, marcador de peso molecular (*Ladder* 100 pb) (KASVI, Curitiba-PR, Brasil).

3.3 ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DOS GENES *VSIG4*, *FCN1* e *FCN2*

Neste estudo foram utilizados os resultados de genotipagem de *FCN1* e *FCN2* do complemento, obtidos anteriormente pela equipe do LIPM. As associações encontradas para o *VSIG4* foram corrigidas pela presença/ausência de polimorfismos dos genes *FCN1* e *FCN2*, previamente associados com a hanseníase (MESSIAS-REASON et al., 2009; BOLDT et al., 2013b).

3.4 MARCADORES PARA VÍRUS DA HEPATITE B

Neste trabalho foram utilizados os resultados dos marcadores para o vírus HBV previamente descritos (LEITÃO et al., 2014). Como critério de coinfeção hanseníase e hepatite B foi considerado resultado reagente para HBsAg somente ou a presença de anti-HBc e anti-HBs. Foram analisados 185 pacientes com hanseníase e 177 controles de Curitiba.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências genotípicas e haplotípicas foram estimadas pela contagem direta. As frequências genotípicas esperadas foram calculadas utilizando-se as equações (BEIGUELMAN, 1994):

$$p = \frac{2 \times \text{♀ AA} + \text{♀ Aa} + \text{♂ A}}{2 \times \text{♀} + \text{♂}}$$

$$q = \frac{2 \times \text{♀ aa} + \text{♀ Aa} + \text{♂ a}}{2 \times \text{♀} + \text{♂}}$$

As frequências observadas e esperadas foram analisadas pelo teste do qui-quadrado para determinar a hipótese do equilíbrio de Hardy e Weinberg (HW) em homens e mulheres ($P < 0,05$). Em mulheres, a hipótese de equilíbrio de HW foi

verificada segundo Guo e Thompson (1992) no programa *ARLEQUIN* versão 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). As frequências haplotípicas foram determinadas por contagem direta e comparadas com as frequências obtidas pelo algoritmo de máxima expectativa no programa *HAPSTAT* versão 2.0 (LIN et al., 2008).

Para as análises de associação foram realizados testes de independência entre as variáveis utilizando-se os testes do qui-quadrado com correção de Yates ou teste exato de Fisher bicaudal. Quando apropriado, foi calculado o *odds ratio*, com intervalo de confiança de 95%. Valores de P menores que 0,05 foram considerados significativos.

O teste da homogeneidade entre a distribuição de genótipos e haplótipos dos grupos investigados foram avaliadas utilizando-se os testes exatos propostos por Raymond e Rousset (1996), no pacote de programas *ARLEQUIN* versão 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). Para as análises de associação dos haplótipos, foi realizado o teste exato de Fisher bicaudal e regressão logística binária, com o programa estatístico *STATA* versão 9.2. O desequilíbrio de ligação foi determinado com o programa *HAPLOVIEW* versão 4.2 (BARRET et al., 2005). A árvore filogenética do *VSIG4* foi construída com o programa *MEGA6* (TAMURA et al., 2013). As análises *in silico* dos polimorfismos de *VSIG4* associados com hanseníase, foram realizadas pelos programas estatísticos *Human Splicing Finder - HSF* versão 3.0 (DESMET et al., 2009) e *HaploReg* versão 2 (WARD; KELLIS, 2012).

4 RESULTADOS

4.1 EQUILÍBRIO DE HARDY E WEINBERG

Os grupos controle da população de Curitiba e de Sinop encontram-se em equilíbrio de Hardy e Weinberg (HW) para a região promotora (Curitiba $P=0,385$; Sinop $P=0,330$), intron 1 – exon2 (Curitiba $P=0,071$; Sinop $P=0,547$) e intron 3 (Curitiba $P=0,217$; Sinop $P=0,548$). Nos pacientes de Curitiba, foi encontrado um desvio significativo do equilíbrio quando os SNPs na região promotora foram avaliados, provavelmente devido a ausência de *TC/TC* em homozigotas e o excesso de *TC* observado em hemizigotos ($P=0,017$), e no intron 3, provavelmente devido a deficiência de *CG/CG* em homozigotas e excesso de *CG* em hemizigotos ($P=0,024$). Nos pacientes de Sinop, um desvio significativo ocorreu no intron 1 – exon 2, provavelmente devido o excesso de *GC/GC* em homozigotas e à deficiência de *GC* em hemizigotos ($P<0,0001$).

A análise do equilíbrio de HW para os haplótipos completos em mulheres (GUO; THOMPSON, 1992), apresentou um desvio significativo em pacientes de Sinop ($P<0,0001$), similar ao calculado em homens e mulheres para o intron 1 – exon 2. As frequências haplotípicas em pacientes femininas de Curitiba encontram-se em equilíbrio de HW.

A rejeição da hipótese de HW em pacientes sugere uma possível associação dos polimorfismos estudados com hanseníase. A possibilidade de erro de genotipagem é mínima em razão do uso de controles endógenos e repetição da PCR-SSP quando necessário.

4.2 DIFERENCIAÇÃO POPULACIONAL

As frequências alélicas e haplotípicas dos quatro grupos do presente estudo foram analisadas pelo teste exato de Raymond e Rousset (1995) e foi observada uma diferenciação populacional entre os pacientes de Curitiba e pacientes de Sinop

e entre os controles de Curitiba e controles de Sinop (Tabela 6). O fato do grupo de pacientes de Curitiba e controles de Sinop serem considerados semelhantes ($P=0,28284$) sugere um possível viés na heterogeneidade das amostras.

TABELA 6 – DIFERENCIAÇÃO POPULACIONAL ($P \pm$ DESVIO PADRÃO)*

	Pacientes Curitiba	Pacientes Sinop	Controles Curitiba
Pacientes Sinop	0,00000		
Controles Curitiba	0,01319 ($\pm 0,0017$)	0,00000	
Controles Sinop	0,28284 ($\pm 0,0139$)	0,00029 ($\pm 0,0003$)	0,02798 ($\pm 0,0029$)

NOTA: Em destaque (negrito) = populações homogêneas. *Teste exato de Raymond e Rousset (1995).

Considerando os grupos étnicos euro-brasileiros e afro-brasileiros, foi observada heterogeneidade populacional entre os pacientes de Curitiba e pacientes de Sinop ($P=0,00000 \pm 0,0000$) e entre os controles de Curitiba e controles de Sinop ($P=0,00000 \pm 0,0000$).

Devido às diferenças populacionais, as análises subsequentes foram realizadas em dois grupos distintos, um grupo incluindo controles e pacientes de Curitiba e outro grupo incluindo controles e pacientes de Sinop.

4.3. DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS DO GENE *VSIG4*

Os SNPs do promotor (-685), intron 1 (+6069) e intron 3 (+10234, +10899) do gene *VSIG4* apresentaram forte desequilíbrio de ligação em pacientes e controles, euro- e afro-brasileiros ($LOD \geq 2$, $D'=1$ ou $LOD \geq 2$ e D' entre 0 e 1), justificando a análise em haplótipos de cada um dos grupos (promotor, intron 1 e intron 3). Os SNPs -1431 (rs2284705) da região promotora e +6432 (rs34581041) do exon 2 não foram analisados, o primeiro porque o alelo T é monomórfico nas duas populações estudadas e o segundo porque o alelo T foi observado em apenas dois indivíduos (um controle e um paciente), ambos de Curitiba (Figura 20).

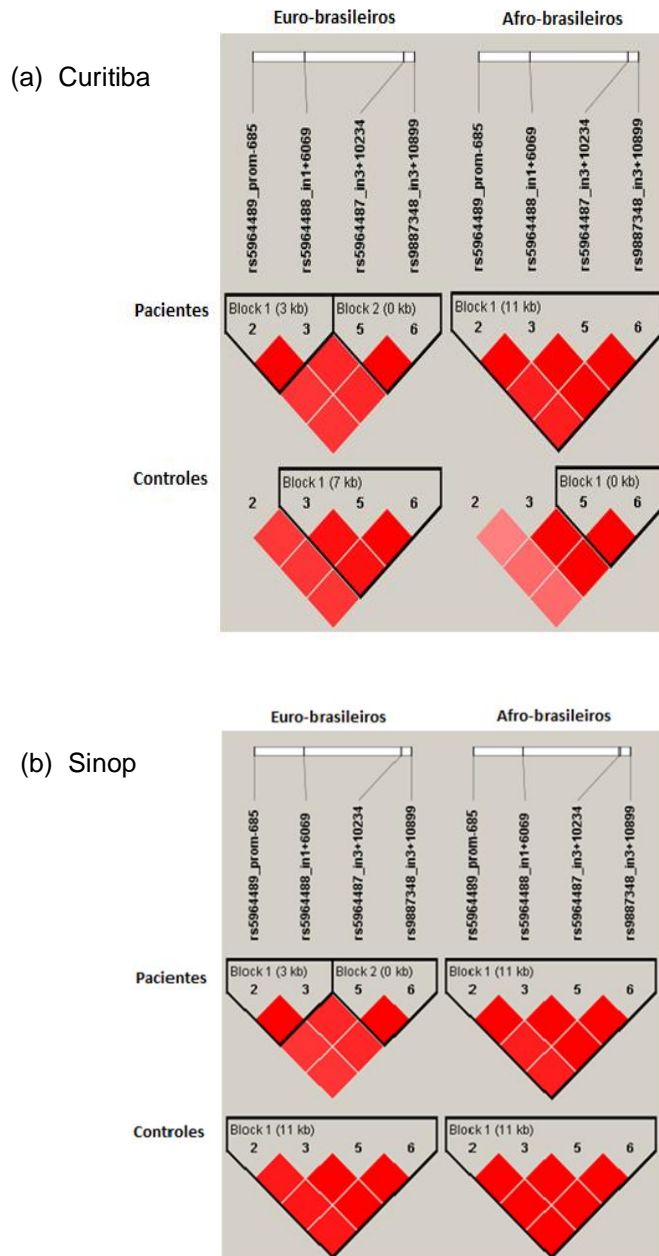


FIGURA 20 - DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS SNPs DO GENE *VSIG4* EM CURITIBA E SINOP

LEGENDA: prom = promotor; in1 = intron 1; in3 = intron 3; tons de rosa = $\text{LOD} \geq 2$ e $D' < 1$; vermelho = $\text{LOD} \geq 2$ e $D' = 1$; $\text{LOD} = \text{Log of the likelihood odds ratio score}$.

NOTA: $\text{LOD} \geq 2$ = desequilíbrio de ligação significativo; $D' = 0$ sem desequilíbrio de ligação; $D' = 1$ desequilíbrio de ligação absoluto; foi utilizado o programa *HAPLOVIEW* versão 4.2. Os SNPs 1 e 4, -1431 (rs2284705) da região promotora e +6432 (rs34581041) do exon 2, respectivamente, não foram analisados, o primeiro porque o alelo T é monomórfico nas duas populações estudadas e o segundo porque o alelo T foi observado em apenas dois indivíduos (um controle e um paciente), ambos de Curitiba.

FONTE: O autor.

4.4. FREQUÊNCIAS DA COMBINAÇÃO DE HAPLÓTIPOS E ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS COM HANSENÍASE POR REGIÃO DO GENE *VSIG4*

As frequências genotípicas dos polimorfismos do gene *VSIG4* no promotor, intron 1 – exon 2 e intron 3 foram determinadas por contagem direta. O alelo *T* na posição -1431 é monomórfico nas populações estudadas. A frequência observada do haplótipo *GC* do intron 1 – exon 2 em pacientes de Curitiba do sexo masculino (35/117 ou 30%) foi significativamente maior em relação ao grupo controle (15/106 ou 14,1%), com $OR=2,6$ [$IC_{95\%}=1,3-5,1$], $P=0,006$. Similarmente, foi observada diferença significativa entre as pacientes homozigotas *GC/GC* de Sinop (23/83 ou 27,7%) em relação as mulheres do grupo controle (6/67 ou 9%), com $OR=3,9$ [$IC_{95\%}=1,5-10,2$], $P=0,004$, constituindo um fator de suscetibilidade à hanseníase. A frequência do haplótipo *CG* do intron 3 em pacientes de Curitiba do sexo masculino (36/117 ou 30,8%) foi significativamente maior em relação aos controles (18/107 ou 16,8%), com $OR=2,2$ [$IC_{95\%}=1,2-4,2$], $P=0,012$, constituindo um fator de suscetibilidade à hanseníase (Tabela 7).

4.4. SEQUÊNCIA DOS PASSOS MUTACIONAIS E ÁRVORE FILOGENÉTICA DOS HAPLÓTIPOS DO GENE *VSIG4*

Os seis SNPs do gene *VSIG4* identificados compõem nove diferentes haplótipos: *TCACCG*, *TCGCCG*, *TCGCTA*, *TCACTA*, *TCGTCTG*, *TGACTA*, *TGGCTA*, *TGGCCG*, *TGACCG*. A sequência dos passos mutacionais dos haplótipos do gene *VSIG4* foi elaborada a partir do provável ancestral africano *TCGCCG*. Os alelos mais comuns encontrados em africanos foram considerados para definir o haplótipo ancestral (CUNNINGHAM et al., 2015) (Tabela 8).

Mutações ocorridas no haplótipo ancestral africano provavelmente formaram os haplótipos *TGGCCG*, *TGGCTA*, *TGACTA* e *TCGTCTG*. Os haplótipos *TCGCTA* e *TGACCG* provavelmente foram originados após a recombinação gênica entre os haplótipos *TGACTA* e *TCGCCG*. O haplótipo *TCACCG* pode ter sido originado após recombinação gênica entre os haplótipos recombinantes *TCGCTA* e *TGACCG* ou por mutação recorrente a partir do haplótipo *TGACCG* (Figura 21).

TABELA 7 - FREQUÊNCIA GENOTÍPICA (%) DO VS/G4 NO PROMOTOR, INTRON 1 – EXON 2 E INTRON 3 EM INDIVÍDUOS DE (a) CURITIBA E (b) SINOP

(a) Curitiba

Posição	Sexo	Genótipo	Frequência (%)		P*	OR [IC95%]
			Controles N= 248	Pacientes N = 265		
Promotor -1431,-685	F	TG/TG	67,6	72,9	n.s.	n.a.
		TG/TC	28,2	27,1	n.s.	n.a.
		TC/TC	4,2	0	n.s.	n.a.
	M	TG	84,9	76,1	n.s.	n.a.
		TC	15,1	23,9	n.s.	n.a.
Intron 1 - Exon 2 +6069,+6432	F	AC/AC	62,0	64,9	n.s.	n.a.
		AC/GC	33,8	29,7	n.s.	n.a.
		GC/GC	4,2	4,1	n.s.	n.a.
		AC/GT	0	1,3	n.s.	n.a.
	M	AC	85,0	69,2	n.s.	n.a.
		GC	14,1	30,0	0,006	2,6 [1,3-5,1]
		GT	0,9	0,8	n.s.	n.a.
Intron 3 +10234,+10899	F	TA/TA	67,6	64,9	n.s.	n.a.
		TA/CG	26,8	32,4	n.s.	n.a.
		CG/CG	5,6	2,7	n.s.	n.a.
	M	TA	83,0	69,2	n.s.	n.a.
		CG	17,0	30,8	0,012	2,2 [1,2-4,2]

(b) Sinop

Posição	Sexo	Genótipo	Frequência (%)		P*	OR [IC95%]
			Controles N=188	Pacientes N=253		
Promotor -1431,-685	F	TG/TG	61,1	51,8	n.s.	n.a.
		TG/TC	31,3	39,8	n.s.	n.a.
		TC/TC	7,5	8,4	n.s.	n.a.
	M	TG	75,9	75,9	n.s.	n.a.
		TC	24,1	24,1	n.s.	n.a.
Intron1 - Exon2 +6069,+6432	F	AC/AC	53,7	42,2	n.s.	n.a.
		AC/GC	37,3	30,1	n.s.	n.a.
		GC/GC	9,0	27,7	0,004	3,9 [1,5-10,2]
	M	AC	74,1	71,3	n.s.	n.a.
		GC	25,9	28,7	n.s.	n.a.
Intron3 +10234,+10899	F	TA/TA	53,7	44,6	n.s.	n.a.
		TA/CG	37,1	39,8	n.s.	n.a.
		CG/CG	9,0	15,7	n.s.	n.a.
	M	TA	74,1	72,4	n.s.	n.a.
		CG	25,9	27,6	n.s.	n.a.

LEGENDA: N = número de cromossomos; OR = razão de chances; IC = intervalo de confiança; F = feminino; M = masculino; n.s. = não significativo; n.a. = não aplicável.

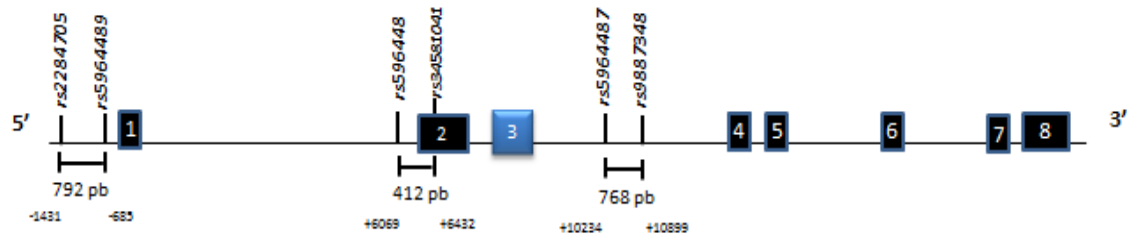
NOTA: Em destaque (negrito) = associação com hanseníase; * Calculado pelo teste exato de Fisher bicaudal.

TABELA 8 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO GENE *VS/G4* EM EURO- E AFRO-BRASILEIROS DE CURITIBA E SINOP, E EM OUTRAS POPULAÇÕES

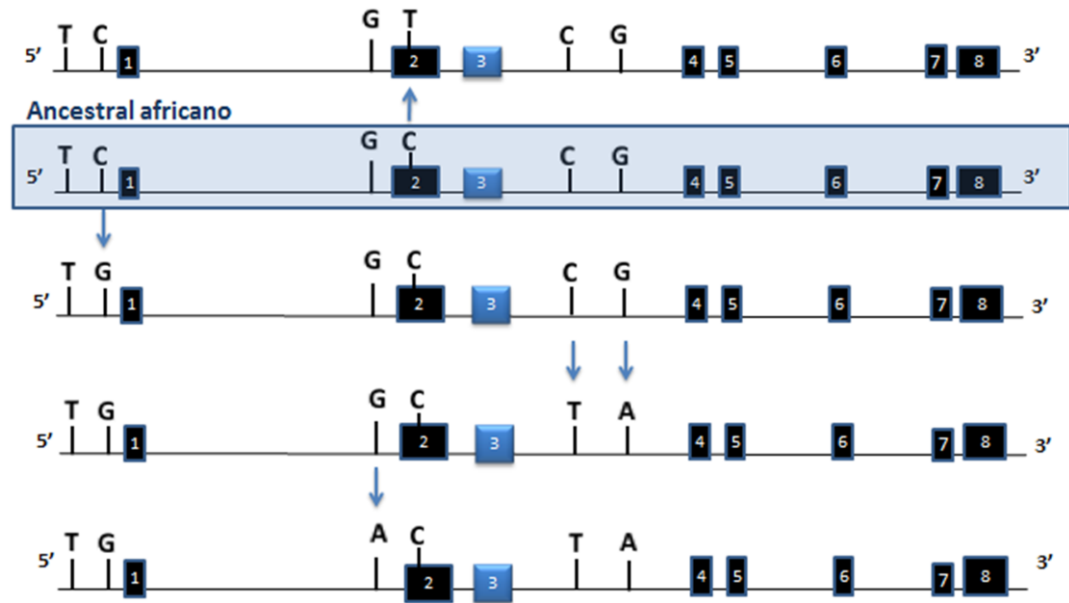
SNP	Alelo	Curitiba		Sinop		Outras populações				
		Euro (N=205) % (N)	Afro (N=43)	Euro (N=117)	Afro (N=69)	ASN (N=428)	YRI (N=133)	IBS (N=21)	CLM (N=91)	CEU (N=125)
rs2284705	A	0	0	0	0	7 (28)	0	0	0	0
rs59664489	C	13,7 (28)	27,9 (12)	22,2 (26)	26,1 (18)	0	74 (99)	5 (1)	16 (15)	20 (25)
rs5964488	G	17,5 (36)	23,3 (10)	25,7 (30)	30,4 (21)	0	94 (125)	5 (1)	19 (17)	20 (25)
rs34581041	T	0,5 (1)	0	0	0	0	2 (3)	0	0	0
rs5964487	C	17,1 (35)	30,2 (13)	25,7 (30)	30,4 (21)	0	94 (125)	5 (1)	19 (17)	19 (24)
rs9887348	G	17,1 (35)	30,2 (13)	25,7 (30)	30,4 (21)	0	94 (125)	5 (1)	19 (17)	20 (25)

LEGENDA: N = número de cromossomos; Euro = euro-brasileiros; Afro = afro-brasileiros; ASN = asiáticos; YRI = Yoruba, Nigéria; IBS = Espanha; CLM = Medellin, Colômbia; CEU = Utah, Europeus.

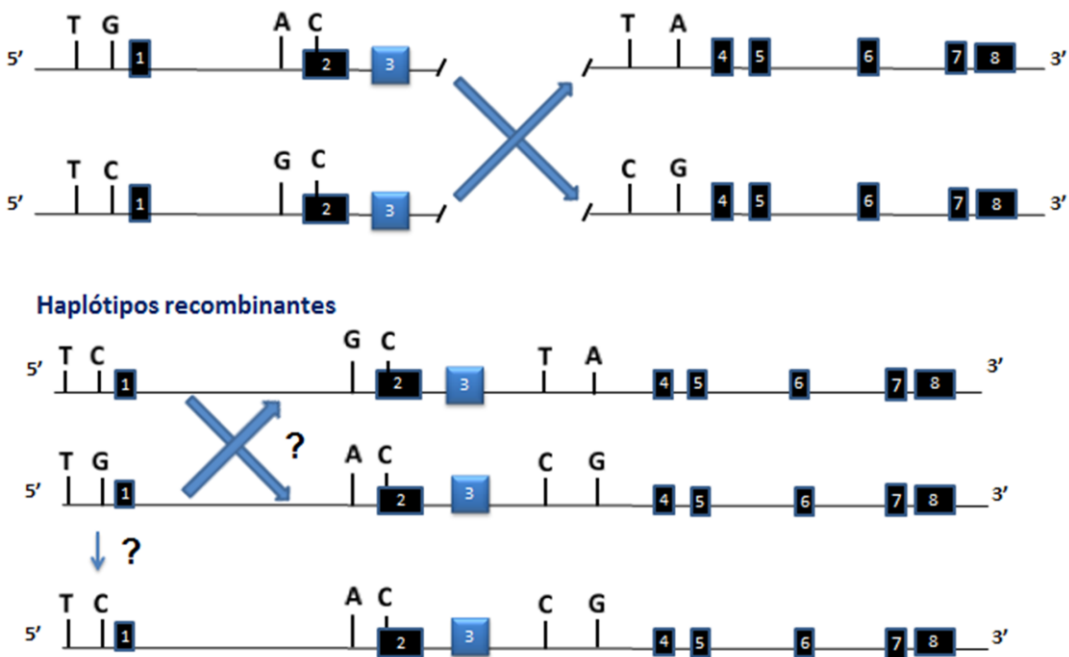
FONTE: CUNNINGHAM et al., 2015; 1000 Genomes Project, 2012.



(a)



(b)



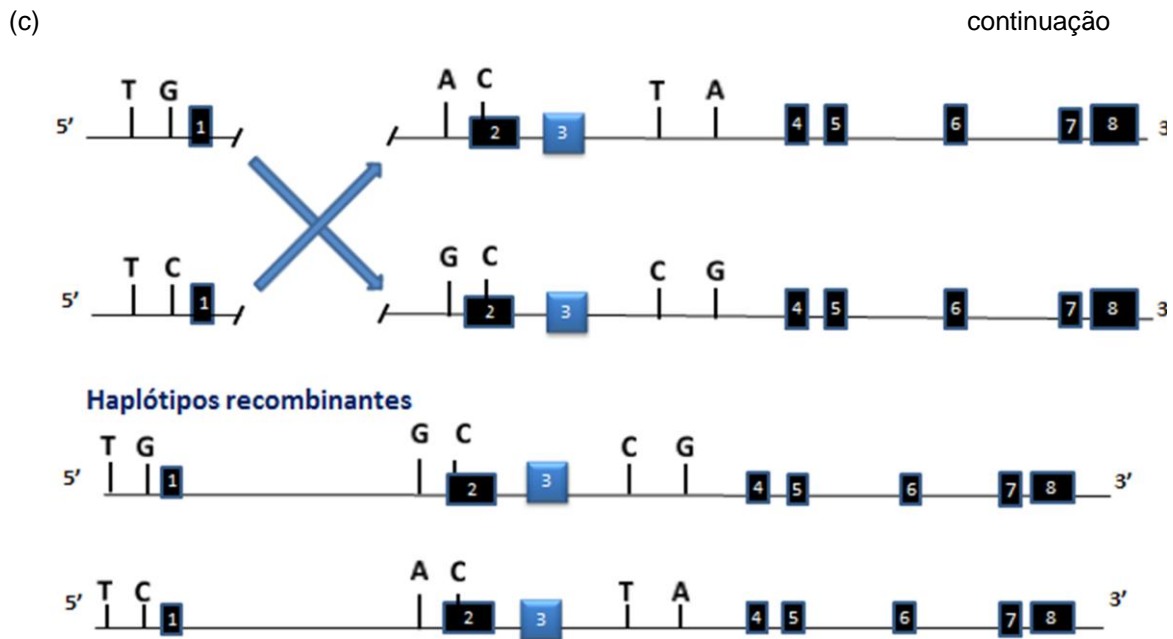


FIGURA 21 – SEQUENCIA DOS PASSOS MUTACIONAIS DOS HAPLOTIPOS DO GENE *VSIG4* A PARTIR DO (a) ANCESTRAL AFRICANO E (b,c) POR RECOMBINAÇÃO

LEGENDA: 1 a 8 = exons do gene *VSIG4*; em azul = exon alternativo 3.

NOTA: (?) = a provável origem do haplótipo *TCACCG* pode ser decorrente de recombinação gênica ou mutação recorrente.

Neste trabalho propomos uma nomenclatura filogenética provisória (necessário fazer sequenciamento para considerar definitiva) (NEBERT, 2002), para os cinco haplótipos mais comuns formados a partir dos SNPs estudados. Esta nomenclatura foi sugerida a partir da construção de uma árvore genética baseada em máxima verossimilhança, excluindo-se os haplótipos recombinantes. O haplótipo considerado ancestral *TCGCCG* recebe o número *1, os haplótipos derivados recebem o número *2 e os descendentes destes são representados por letras e números subsequentes, *2A no lugar de *TCGTCTG*, *2B no lugar de *TGGCCG*, *2B1 no lugar de *TGGCTA* e *2B2 no lugar de *TGACTA* (Figura 22).

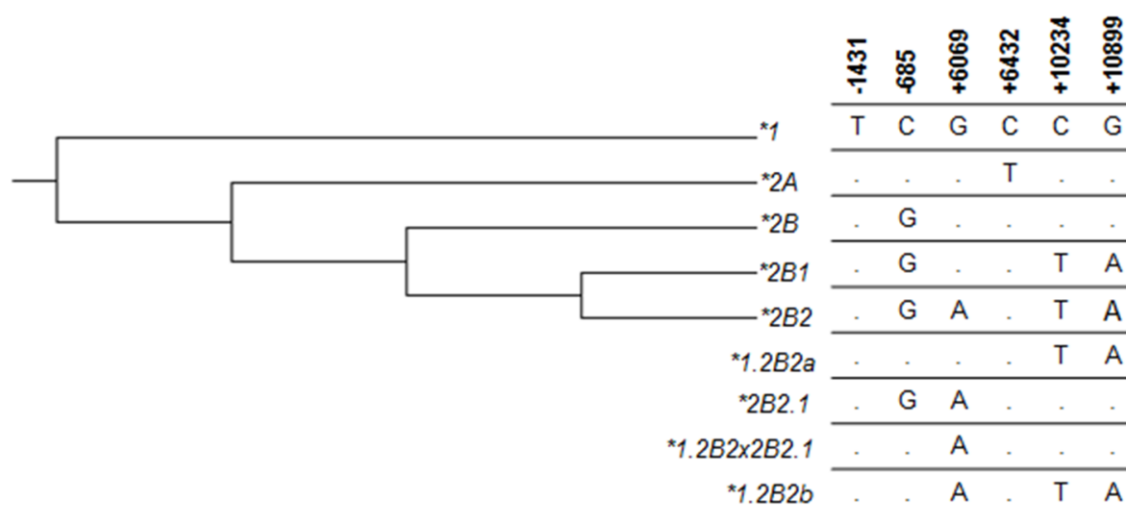


FIGURA 22 – NOMENCLATURA FILOGENÉTICA PROPOSTA PARA OS HAPLÓTIPOS DO GENE *VSIG4*

NOTA: a história evolutiva foi inferida pelo uso do método de máxima verossimilhança baseado no modelo de Tamura & Nei (1993) através do programa MEGA6 (Tamura et al., 2013). A árvore com o maior probabilidade logarítmica (log -17212.9370) é demonstrada.

FONTE: O autor.

4.5. FREQUÊNCIAS DOS HAPLÓTIPOS COMPLETOS DO GENE *VSIG4*

As frequências haplotípicas obtidas por contagem direta com base na amplificação sequência específica e no desequilíbrio de ligação entre as variantes foram similares às frequências haplotípicas obtidas com o algoritmo de máxima expectativa utilizando programa *HAPSTAT* e com os algoritmos de máxima expectativa e pseudobayesiano utilizando o programa *ARLEQUIN*.

Os haplótipos observados com maior frequência foram *2B2 (*TGACTA*), *1 (*TCGCCG*) e *2B (*TGGCCG*). Foram identificados oito haplótipos na população de Curitiba e seis haplótipos na população de Sinop. Os haplótipos raros *2A (*TCGTCTG*) e *1.2B2x2B2.1 (*TCACCG*) foram observados exclusivamente na população de Curitiba, enquanto que o haplótipo *1.2B2A (*TCGCTA*) foi observado exclusivamente nos pacientes de Sinop. Em indivíduos do sexo feminino não foi observado o haplótipo raro *1.2B2x2B2.1 (*TCACCG*). Os haplótipos *1.2B2x2B2.1 (*TCACCG*) e *1.2B2B (*TCACTA*) não foram observados em pacientes (Tabela 9).

TABELA 9 - FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA (% \pm desvio padrão) DO GENE *VSIG4* EM CONTROLES E PACIENTES COM HANSENIASE DE CURITIBA E SINOP

Haplótipo		Curitiba		Sinop	
	Nomenclatura filogenética	Controles N =248	Pacientes N = 265	Controles N =188	Pacientes N =253
<i>TGACTA</i>	*2B2	78,3 (\pm 2,6)	75,5 (\pm 2,6)	72,3 (\pm 3,3)	62,1 (\pm 3,1)
<i>TCGCCG</i>	*1	13,7 (\pm 2,2)	17,3 (\pm 2,3)	22,9 (\pm 3,1)	20,1 (\pm 2,5)
<i>TGGCCG</i>	*2B	2,8 (\pm 1,0)	6,0 (\pm 1,5)	4,2 (\pm 1,5)	11,5 (\pm 2,0)
<i>TCGCTA</i>	*1.2B2a	0	0	0	4,7 (\pm 1,3)
<i>TCACTA</i>	*1.2B2.b	2,0 (\pm 0,9)	0	0,5 (\pm 0,5)	0
<i>TGGCTA</i>	*2B1	1,2 (\pm 0,7)	0,4 (\pm 0,4)	0	0,8 (\pm 0,6)
<i>TCACCG</i>	*1.2B2x2B2.1	0,8 (\pm 0,6)	0	0	0
<i>TGACCG</i>	*2B2.1	0,8 (\pm 0,6)	0	0	0,8 (\pm 0,6)
<i>TCGTCG</i>	*2A	0,4 (\pm 0,4)	0,8 (\pm 0,5)	0	0

LEGENDA: N = número de cromossomos.

Considerando o grupo étnico, foram identificados em euro- e afro-brasileiros de Curitiba, sete e seis haplótipos, respectivamente. Na população de Sinop, foram identificados em euro- e afro-brasileiros, sete e quatro haplótipos, respectivamente. Não foi encontrado o haplótipo *2B1 (*TGGCTA*) em afro-brasileiros de ambas populações (Tabela 10).

Os pacientes foram agrupados em virchowianos e outras formas clínicas de hanseníase (tuberculoide, indeterminada e dimorfa) para determinação das frequências e análise multivariada. Nos pacientes de Curitiba, foram observados cinco haplótipos em virchowianos e três haplótipos nas outras formas clínicas de hanseníase (tuberculoide, dimorfa e indeterminada). Nos pacientes de Sinop com hanseníase virchowiana e com outras formas clínicas, foram observados quatro e seis haplótipos, respectivamente (Tabela 11).

TABELA 10 - FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA (% \pm desvio padrão) DO GENE *VSIG4* EM CONTROLES E PACIENTES COM HANSENIASE DE ACORDO COM O GRUPO ÉTNICO EM CURITIBA E SINOP

(a) Curitiba

Haplótipo		Euro-brasileiros		Afro-brasileiros	
	Nomenclatura filogenética	Controles N =205	Pacientes N = 224	Controles N =43	Pacientes N =41
TGACTA	*2B2	80,5 (\pm 2,8)	80,8 (\pm 2,6)	65,1 (\pm 0,7)	46,3 (\pm 7,9)
TCGCCG	*1	12,7 (\pm 2,3)	14,7 (\pm 2,4)	18,6 (\pm 6,0)	31,7 (\pm 7,3)
TGGCCG	*2B	2,4 (\pm 1,1)	3,1 (\pm 1,2)	4,7 (\pm 3,2)	22,0 (\pm 6,5)
TCACTA	*1.2B2b	0,5 (\pm 0,5)	0	4,7 (\pm 3,2)	0
TGGCTA	*2B1	1,9 (\pm 0,8)	0,5 (\pm 0,4)	0	0
TCACCG	*1.2B2x2B2.1	0	0	4,6 (\pm 3,2)	0
TGACCG	*2B2.1	1,5 (\pm 0,8)	0	2,3 (\pm 2,3)	0
TCGTCG	*2A	0,5 (\pm 0,5)	0,9 (\pm 0,6)	0	0

(b) Sinop

Haplótipo		Euro-brasileiros		Afro-brasileiros	
	Nomenclatura filogenética	Controles N =117	Pacientes N = 164	Controles N =69	Pacientes N =87
TGACTA	*2B2	73,5 (\pm 4,1)	71,4 (\pm 3,5)	69,6 (\pm 0,5)	42,6 (\pm 5,4)
TCGCCG	*1	21,4 (\pm 3,8)	13,4 (\pm 2,7)	26,1 (\pm 5,3)	33,3 (\pm 5,2)
TGGCCG	*2B	4,3 (\pm 1,9)	7,9 (\pm 2,1)	4,3 (\pm 2,5)	18,4 (\pm 4,3)
TCGCTA	*1.2B2a	0	4,9 (\pm 1,7)	0	5,7 (\pm 2,3)
TGGCTA	*2B1	0	1,2 (\pm 0,8)	0	0
TGACCG	*2B2.1	0	1,2 (\pm 0,8)	0	0
TCACTA	*1.2B2b	0,8 (\pm 0,8)	0	0	0

Legenda: N = número de cromossomos.

TABELA 11 - FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA (% \pm desvio padrão) DO GENE *VSIG4* DE ACORDO COM A FORMA CLÍNICA DA HANSENÍASE

Haplótipo		Curitiba		Sinop	
	Nomenclatura filogenética	Virchowianos N=151	Outras formas clínicas N=83	Virchowianos N=34	Outras formas clínicas N=214
<i>TGACTA</i>	<i>*2B2</i>	73,5 (\pm 3,6)	79,6 (\pm 4,4)	50 (\pm 8,7)	63,1 (\pm 3,3)
<i>TCGCCG</i>	<i>*1</i>	19,9 (\pm 3,2)	12 (\pm 3,6)	32,3 (\pm 8,1)	18,7 (\pm 2,7)
<i>TGGCCG</i>	<i>*2B</i>	4,6 (\pm 1,7)	8,4 (\pm 3,1)	11,8 (\pm 5,6)	11,2 (\pm 2,2)
<i>TCGCTA</i>	<i>*1.2B2a</i>	0	0	5,9 (\pm 4,1)	4,7 (\pm 1,4)
<i>TGGCTA</i>	<i>*2B1</i>	0,7 (\pm 0,7)	0	0	1,4 (\pm 0,8)
<i>TCGTCG</i>	<i>*2A</i>	1,3 (\pm 0,9)	0	0	0
<i>TGACCG</i>	<i>*2B2.1</i>	0	0	0	0,9 (\pm 0,6)

LEGENDA: N = número de cromossomos.

NOTA: Outras formas clínicas=pacientes com as formas clínicas dimorfa, tuberculóide e indeterminada.

4.6. ASSOCIAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS COMPLETOS DO GENE *VSIG4* COM A HANSENÍASE

Os haplótipos **2B* (*TGGCCG*) e **1* (*TCGCCG*) foram associados com suscetibilidade à hanseníase, enquanto que o haplótipo **2B2* (*TGACTA*) foi associado com proteção à doença. Todas as análises foram corrigidas pela idade. As associações encontradas nas populações de Curitiba e de Sinop serão descritas a seguir e estão demonstradas na tabela 12.

4.6.1 Associação com suscetibilidade à hanseníase

4.6.1.2 População de Curitiba

Na população de Curitiba, a presença do haplótipo **2B* (*TGGCCG*) foi associada com suscetibilidade à hanseníase *per se* em homens e mulheres heterozigotas **2B* (*TGGCCG*)/*TCGCCG* (OR=5,57 [IC95%=1,15-27,06], P=0,033).

TABELA 12 - ASSOCIAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS DO GENE *VSIG4* COM HANSENÍASE*

Haplótipo	Grupo	Curitiba		Sinop	
		P	OR [IC95%]	P	OR [IC95%]
Associação de suscetibilidade à hanseníase					
*2B (TGGCCG) excluindo mulheres heterozigotas com *2B2 (TGACTA)	Total	0,045	4,81 [1,04-22,25]	n.s.	n.a.
*2B (TGGCCG)	M	0,033	5,57 [1,15-27,06]	n.s.	n.a.
*2B (TGGCCG)/*1 (TCGCCG)	F				
*2B (TGGCCG)	Total	0,061**	2,52 [0,95-6,62]	0,060**	1,6 [0,98-2,61]
	M	0,066**	4,8 [0,90-26,06]	n.s.	n.a.
	F	n.s.	n.a.	0,005	3,69 [1,48-9,20]
	F (>40a)	n.s.	n.a.	0,015	3,86 [1,29-11,52]
*1 (TCGCCG)	Total	0,113**	1,56 [0,90-2,71]	n.s.	n.a.
	M	0,126**	1,84 [0,84-4,01]	n.s.	n.a.
	M (18-40a)	0,038	3,55 [1,07-11,74]	n.s.	n.a.
*1 (TCGCCG) ou *2B (TGGCCG)	Total	0,035	1,98 [1,05-3,74]	n.s.	n.a.
	M	0,024	2,17 [1,11-4,24]	n.s.	n.a.
	M (18-40a)	0,041	3,42 [1,05-11,13]	n.s.	n.a.
	Virchow	n.s.	n.a.	0,038	2,65 [1,05-6,69]
Associação de proteção à hanseníase					
*2B2 (TGACTA)	Total	0,038	0,52 [0,28-0,96]	0,012	0,47 [0,26-0,85]
	M	0,022	0,43 [0,21-0,88]	n.s.	n.a.
	M (18-40a)	0,008	0,21 [0,06-0,66]	n.s.	n.a.
	F	n.s.	n.a.	0,006	0,26 [0,10-0,67]
	F (>40a)	n.s.	n.a.	0,019	0,2 [0,05-0,76]
	Virchow	n.s.	n.a.	0,082**	0,46 [0,19-1,10]

LEGENDA: M = sexo masculino; F = sexo feminino; 18-40a = indivíduos com idade entre 18 e 40 anos; > 40a = indivíduos com mais de 40 anos; Virchow = pacientes com a forma clínica virchowiana; n.s. = não significativo; n.a. = não aplicável.

NOTA: *Todas as análises foram corrigidas pela idade e significativo se $P < 0,05$; **tendência a associação; total = sexo masculino e feminino. Análise de regressão logística realizada com o programa estatístico STATA versão 9.2.

As frequências das mulheres heterozigotas **2B (TGGCCG)/*2B2 (TGACTA)* não diferiram entre controles e pacientes. Houve uma tendência de associação com a presença/ausência do haplótipo **2B (TGGCCG)*, incluindo todas as mulheres heterozigotas (OR=2,52 [IC95%=0,95-6,62], P=0,061).

Foi observada uma tendência de associação entre a presença/ausência do haplótipo **1 (TCGCCG)* com suscetibilidade à hanseníase no grupo de Curitiba (OR=1,56 [IC95%=0,90-2,71], P=0,113). Finalmente, foi verificada associação entre a presença dos haplótipos **1 (TCGCCG)* e **2B (TGGCCG)* em indivíduos hemizigotos, homozigotos e heterozigotos compostos com suscetibilidade à hanseníase (OR=1,98 [IC95%=1,05-3,74], P=0,035).

Para avaliar se a associação está restrita a um dos sexos ou a uma determinada faixa etária, foi feita uma análise multivariada para os grupos masculino e feminino, isoladamente. Há uma tendência a associação de suscetibilidade em indivíduos do sexo masculino com o haplótipo **2B (TGGCCG)* (OR=4,8 [IC95%=0,90-26,06], P = 0,066). O haplótipo **1 (TCGCCG)*, embora não esteja associado à hanseníase em indivíduos do sexo masculino de todas as idades (OR=1,84 [IC95%=0,84-4,01], P=0,126), apresenta-se associado em homens jovens (18 a 40 anos) (OR=3,55 [IC95%=1,07-11,74], P=0,038). Esta associação em homens jovens permanece quando os haplótipos **1 (TCGCCG)* e **2B (TGGCCG)*, que diferem unicamente na posição -685 do promotor, são reunidos (OR=3,42 [IC95%=1,05-11,13], P=0,041). Além disso, essa associação ocorre independentemente da faixa etária (OR=2,17 [IC95%=1,11-4,24], P=0,024). Não foi observada associação nas análises restritas a homens acima de 40 anos.

Considerando os indivíduos do sexo feminino, não foi observada associação entre os polimorfismos e haplótipos de *VSIG4* e a hanseníase nos grupos de Curitiba. Também não foi observada associação dos haplótipos do gene *VSIG4* com as formas clínicas da hanseníase na população de Curitiba.

4.6.1.2 População de Sinop

A tendência de associação de suscetibilidade com o haplótipo **2B (TGGCCG)* que ocorreu na população de Curitiba foi confirmada em Sinop (OR=1,60 [IC95%=0,98-2,61], P=0,060). Essa associação de suscetibilidade, contudo, foi evidenciada somente em mulheres (OR=3,69 [IC95%=1,48-9,20], P=0,005), e

especificamente em mulheres acima de 40 anos (OR=3,86 [IC95%=1,29-11,52], P=0,015), porém não em homens.

Ao contrário do observado na população de Curitiba, não houve associação entre a presença/ausência do haplótipo *1 (*TCGCCG*), mesmo somado à presença ou ausência do haplótipo *2B (*TGGCCG*), com suscetibilidade à hanseníase em Sinop.

Porém, ao contrário de Curitiba, foi observada associação de suscetibilidade entre indivíduos portadores dos haplótipos *2B (*TGGCCG*) ou *1 (*TCGCCG*) (em hemizigose, homozigose ou heterozigose composta) e a hanseníase virchowiana (OR=2,65 [IC95%=1,05-6,69], P=0,038).

4.6.2 Associação com proteção à hanseníase

4.6.2.1 População de Curitiba

Na população de Curitiba, o haplótipo mais comum *2B2 (*TGACTA*) foi associado com proteção à hanseníase, mesmo após correção por idade, único fator demográfico associado (OR=0,52 [IC95%=0,28-0,96], P=0,038). O efeito protetor do haplótipo *2B2 (*TGACTA*) foi encontrado somente em homens (OR=0,43 [IC95%=0,21-0,88], P=0,022) e em homens jovens (OR=0,21 [IC95%=0,06-0,66], P=0,008).

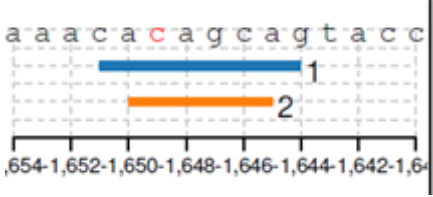
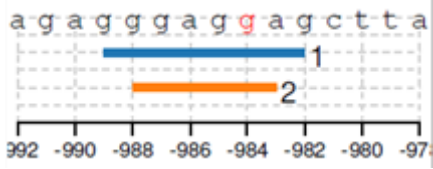
4.6.2.2 População de Sinop

A associação protetora com o haplótipo *2B2 (*TGACTA*) observada na população de Curitiba foi confirmada em Sinop para a população total (OR=0,47 [IC95%=0,26-0,85], P=0,012), em mulheres (OR=0,26 [IC95%=0,10-0,67], P=0,006) e em mulheres com mais de 40 anos (OR=0,2 [IC95%=0,05-0,76], P=0,019). Houve uma tendência de associação do haplótipo *2B2 (*TGACTA*) com a forma clínica virchowiana (OR=0,46 [IC95%=0,19-1,10], P=0,082).

Não foi observada associação com indivíduos do sexo masculino de Sinop.

4.7 ANÁLISE *IN SILICO* DOS POLIMORFISMOS ASSOCIADOS

A análise *in silico* utilizando o programa *Human Splicing Finder* - HSF (DESMET et al., 2009), demonstrou que os polimorfismos do intron 3, rs5964487 (g.15364T>C) e rs9887348 (g.16029A>G), associados com Hanseníase, provavelmente alteram o *splicing* do pré-RNA mensageiro (pré-mRNA), por abolir o sítio silenciador de *splicing* de exon (ESS) (Quadro 3). Não foi detectada alteração significativa para o SNP rs596448 (intron 1, g.11199A>G). Provavelmente, este SNP não altera os mecanismos de *splicing* e a associação com Hanseníase ocorreu devido um efeito carona com o intron 3.

SNP	Algoritmo	Posição	Interpretação
rs5964487 (g.15364T>C)	1 - Motif 1		Destruição do ESS intrônico Potencial alteração do <i>splicing</i>
	2 - HSF Matrices		
rs9887348 (g.16029A>G)	1 - Motif 1		Possível exclusão do exon alternativo 3
	2 - ESR Sequences		

QUADRO 3 – ANÁLISE *IN SILICO* DOS POLIMORFISMOS rs5964487 E rs9887348

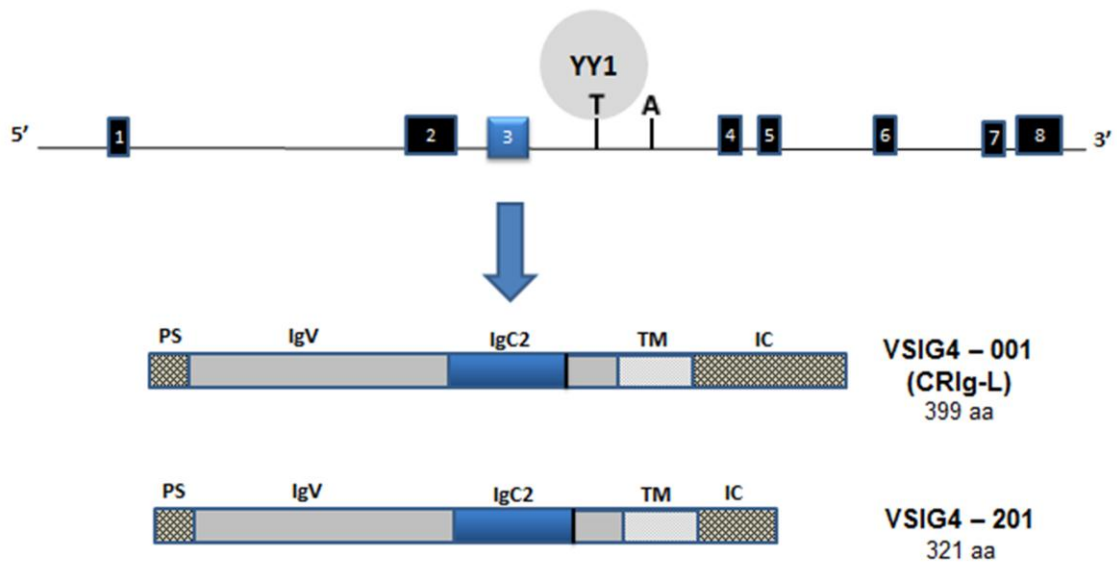
LEGENDA: ESS = sítio silenciador de *splicing* de exon.

NOTA: C e G em vermelho = polimorfismo envolvidos com potencial alteração do *splicing*. Análise realizada com o programa *Human Splicing Finder* - HSF versão 3.0.

FONTE: DESMET et al., 2009.

A análise dos polimorfismos associados à Hanseníase através do programa *HaploReg* permitiu detectar que a substituição T>C na posição +10.234 (rs5964487) do gene *VSIG4*, poderia alterar significativamente o reconhecimento deste sítio pela proteína repressora Yin Yang 1 (YY1). Não foram detectadas alterações significativas para os demais SNPs associados (Figura 23) (WARD; KELLIS, 2012).

(a)



(b)

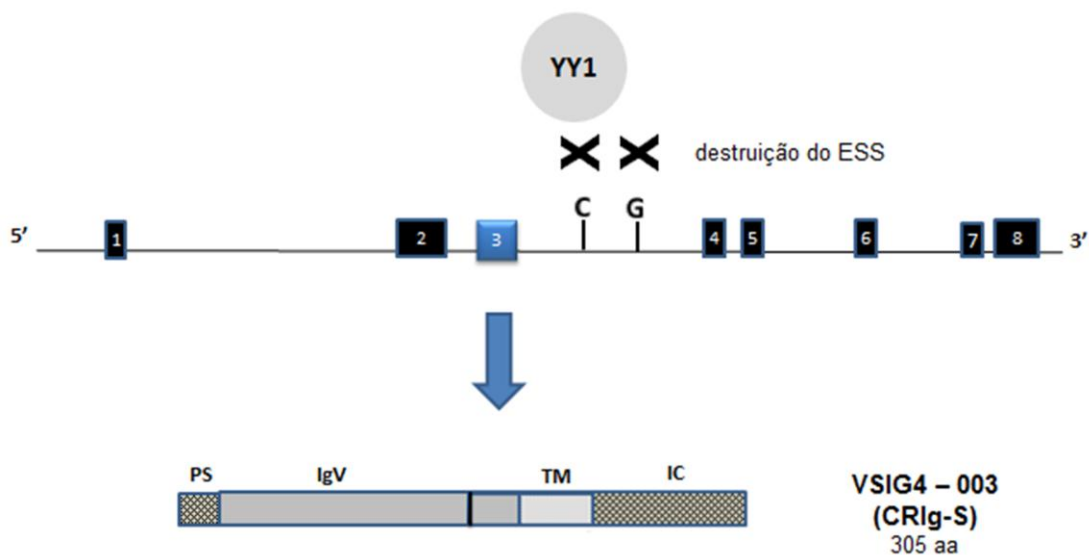


FIGURA 23 – EFEITO PROPOSTO PARA OS SNPs rs5964487 E rs9887348 NO PROCESSAMENTO ALTERNATIVO DO EXON 3

LEGENDA: YY1 = proteína repressora Yin Yang 1; ESS = sítio silenciador de *splicing* de exon; SP = peptídeo sinal; IgV = domínio extracelular de Ig tipo V; IgC2 = domínio extracelular de Ig tipo C2; TM = região transmembranar; IC = região intracelular; CRIg = receptor de complemento da superfamília das imunoglobulinas; CRIg-L = forma longa do CRIg; CRIg-S = forma curta do CRIg.

NOTAS: (a) YY1 reconhece o ESS ligando-se ao alelo T (rs5964487) no pré-mRNA. O exon 3 é transcrito para o RNAm maduro e o domínio IgC2 é expresso, originando as isoformas VSIG4 – 001 (CRIg-L) e VSIG4 – 201. (b) os ESS são destruídos com a presença dos alelos C e G. A substituição T>C na posição +10.234 (rs5964487) do gene VSIG4, possivelmente altera significativamente o reconhecimento deste sítio pela proteína YY1, e o exon 3 é reconhecido como intron, resultando na síntese da isoforma curta VSIG4 – 003 (CRIg-S), sem o domínio IgC2.

FONTE: O autor.

4.8 ASSOCIAÇÃO DO GENE *VSIG4* COM RELAÇÃO AOS POLIMORFISMOS DOS GENES *FCN1* E *FCN2* NA POPULAÇÃO DE CURITIBA

As associações encontradas para o gene *VSIG4* foram corrigidas pela presença/ausência de polimorfismos dos genes *FCN1* e *FCN2* do complemento previamente associados com a doença (*FCN1**3C1: OR= 0,243 [IC95%= 0,083-0,71], $P = 0,003$; *FCN2**AGA: OR=0,13 [IC95%=0,03-0,43], $P < 0,001$). Após correção para *FCN1**3C1, a associação de suscetibilidade com *2B (*TGGCCG*), sem a presença *2B2 (*TGACTA*), permaneceu como uma tendência (OR=4,73 [IC95%=0,97-23,01], $P=0,054$), enquanto a associação com *FCN1**3C1 foi perdida ($P=0,373$). Resultado similar é observado considerando-se a somatória de indivíduos hemizigotos, homozigotas e heterozigotas compostas com *2B (*TGGCCG*) e/ou *1 (*TCGCCG*) (OR= 1,79 [IC95%=0,93-3,43], $P=0,079$ versus *FCN1**3C1 $P=0,301$). A tendência permaneceu também com *2B2 (*TGACTA*) (OR= 0,58 [IC95%=0,31-1,09], $P=0,093$ versus *FCN1**3C1 $P=0,313$) (Tabela 13).

A associação de suscetibilidade do haplótipo *2B (*TGGCCG*) excluindo mulheres com *2B2 (*TGACTA*) (OR=14,1 [IC95%=1,6-124,4], $P=0,017$) é independente do haplótipo *FCN2**AGA, que continua associado com proteção à hanseníase (OR=0,16 [IC95%=0,04-0,66], $P=0,011$). Foi observada associação independente entre o haplótipo *2B (*TGGCCG*) (OR=4,13 [IC95%=1,23-13,8], $P=0,021$) e o haplótipo *FCN2**AGA, que permanece associado com proteção à hanseníase (OR=0,20 [IC95%=0,06-0,73], $P=0,015$). Resultados similares foram observados em hemizigotos, homozigotos e heterozigotos compostos *2B (*TGGCCG*)/*1 (*TCGCCG*) e *FCN2**AGA (OR=3,43 [IC95%=1,53-7,68], $P=0,003$ versus *FCN2**AGA $P=0,009$). Não foi observada associação entre os haplótipos *2B2 (*TGACTA*) e *FCN2**AGA (Tabela 13).

TABELA 13 - ASSOCIAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS DO GENE *VSIG4* COM RELAÇÃO AOS POLIMORFISMOS DOS GENES *FCN1* E *FCN2* NA POPULAÇÃO DE CURITIBA

Haplótipo	<i>VSIG4</i>		<i>FCN1*3C1*</i>	
	P	OR [IC95%]	P	OR [IC95%]
<i>*2B (TGGCCG) excluindo mulheres heterozigotas com *2B2 (TGACTA)</i>	0,054	4,73 [0,97-23,01]	0,373	0,56 [0,15-1,99]
<i>*2B ou *1 (TGGCCG ou TGCCG)</i>	0,079	1,79 [0,93-3,43]	0,301	0,51 [0,14-1,83]
<i>*2B/1* (TGGCCG/TCGCCG)</i>				
<i>*2B2 (TGACTA)</i>	0,093	0,58 [0,31-1,09]	0,313	0,52 [0,14-1,86]
Haplótipo	<i>VSIG4</i>		<i>FCN2*AGA**</i>	
	P	OR [IC95%]	P	OR [IC95%]
<i>*2B (TGGCCG), excluindo mulheres heterozigotas com *2B2 (TGACTA)</i>	0,017	14,1 [1,6-124,4]	0,011	0,16 [0,04-0,66]
<i>*2B (TGGCCG)</i>	0,021	4,13 [1,23-13,8]	0,015	0,20 [0,06-0,73]
<i>*1 (TCGCCG)</i>	0,024	2,19 [1,11-4,31]	0,018	0,22 [0,06-0,77]
<i>*2B (TGGCCG)</i>	0,003	3,43 [1,53-7,68]	0,009	0,17 [0,04-0,64]
<i>*2B/*1 (TGGCCG/TCGCCG)</i>				
<i>*2B2 (TGACTA)</i>	n.s.	n.a.	n.a.	n.a.

LEGENDA: n.s. = não significativo; n.a. = não aplicável.

NOTA: significativo se $P < 0,05$; em destaque (negrito) = associação encontrada após correção. *A associação prévia com *FCN1*3C1* (OR= 0,243 [IC95%= 0,083-0,71], $P = 0,003$) foi perdida; **a associação prévia com *FCN2*AGA*: OR=0,13 [IC95%=0,03-0,43], $P < 0,001$ permaneceu. Análise de regressão logística realizada com o programa estatístico STATA versão 9.2.

FONTE: * BOLDT et al., 2013b; **MESSIAS-REASON et al., 2009.

4.9 ASSOCIAÇÃO DO GENE *VSIG4* COM HANSENÍASE E COINFECÇÃO PELO VÍRUS HBV NA POPULAÇÃO DE CURITIBA

Na população de Curitiba, os genótipos com **2B (TGGCCG)*, mas sem **2B2 (TGACTA)* (no caso das mulheres) estão associados com suscetibilidade à coinfeção hanseníase e hepatite B (OR=14,2 [IC95%=3,70-54,41], $P < 0,001$). A associação de suscetibilidade a hanseníase que era uma tendência pela presença/ausência do haplótipo *TGGCGC*, foi significativa considerando todos os controles como HBV negativos (OR=4,61 [IC95%=1,74-12,21], $P=0,002$). Não foi

observada associação com *1 (TCGCCG) isoladamente, entretanto a associação ocorreu com TGCGGC ou *1 (TCGCCG) (OR=2,76 [IC95%=1,37-5,59], P=0,005) (Tabela 14).

Foi observada associação protetora com o haplótipo *2B2 (TGACTA) e coinfeção hanseníase e hepatite B (OR=0,40 [IC95%=0,2-0,81], P=0,011) (Tabela 14).

TABELA 14 - ASSOCIAÇÃO DOS HAPLÓTIPOS DO GENE VSIG4 COM HANSENÍASE E COINFEÇÃO PELO HBV EM CURITIBA

Haplótipo	P	OR [IC95%]
<i>Associação com suscetibilidade à coinfeção</i>		
*2B (TGGCCG) excluindo mulheres heterozigotas com *2B2 (TGACTA)	< 0,001	14,2 [3,70-54,41]
Presença ou ausência de *2B (TGGCCG) e controles HBV negativos	0,002	4,61 [1,74-12,21]
*1 ou *2B (TCGCCG ou TGGCCG)	0,005	2,76 [1,37-5,59]
<i>Associação com proteção à coinfeção</i>		
*2B2 (TGACTA)	0,011	0,40 [0,2-0,81]

NOTA: Número de amostras = 177 controles HBV negativo; 185 pacientes, 111 HBV negativo e 74 HBV positivo. Critério para HBV positivo: reagente para HBsAg somente ou reagente para anti-HBc e anti-HBs. Análise de regressão logística realizada com o programa estatístico STATA versão 9.2.

5 DISCUSSÃO

A hanseníase é uma doença negligenciada e mesmo com o advento do poliquimioterapia, continua sendo um grave problema de saúde pública em muitos países, inclusive o Brasil. A doença tem um forte estigma psicológico para os pacientes, podendo incapacitá-los fisicamente. No Brasil, mais de 30.000 casos foram diagnosticados no ano de 2013 com coeficiente de prevalência igual a 1,42 casos/10 mil hab (BRASIL, 2014). Neste estudo, foram incluídos controles e pacientes de duas populações distintas, um grupo de Curitiba-PR e região metropolitana, localizada na Região Sul, onde observa-se uma prevalência de 0,9 casos/10 mil hab, e outro grupo do município de Sinop, localizado no estado do MT (Região Centro-Oeste) que tem a maior prevalência de hanseníase no País (9,03 casos/10 mil hab) (BRASIL, 2014).

A compreensão da história natural da hanseníase continua sendo um grande desafio. O *M. leprae* não se multiplica *in vitro*, o que dificulta a elucidação dos mecanismos de evasão do sistema imune. Por outro lado, estudos de associação têm demonstrado a participação de diversos polimorfismos gênicos na suscetibilidade à doença e progressão para suas formas clínicas distintas. Há relatos na literatura de associação com os genes *HLA*, *PARK2* e *PACRG*, genes que codificam citocinas ($LT\alpha$, $TNF\alpha$, IL-10) e genes que codificam proteínas do complemento (MBL, FCN, MASP) (FITNESS et al., 2004; MIRA et al., 2004; ZHANG et al., 2009, 2013; HAGGE et al., 2009; MESSIAS-REASON et al., 2007, 2009; SAPKOTA et al., 2010; BOLDT et al., 2013a, 2013b).

A resposta imune do hospedeiro contra o *M. leprae* é um fator determinante no desenvolvimento da doença. A grande maioria dos indivíduos são resistentes à hanseníase e os indivíduos suscetíveis podem desenvolver duas formas clínicas polares, a tuberculoide, com resposta imune tipo Th1, ou a forma mais grave virchowiana, com resposta imune tipo Th2 (MODLIN, 1994; MISCH, 2010).

O *M. leprae* necessita de células viáveis para se estabelecer no hospedeiro. As células alvo do bacilo são macrófagos e células de Schwann. O reconhecimento e fagocitose do *M. leprae* pelos macrófagos é essencial para o início do processo infeccioso. Sabe-se que os macrófagos reconhecem os bacilos opsonizados com C3b através de receptores de complemento CR1, CR3 e CR4 (SCHLESINGER; HORWITZ, 1990). O mais recentemente descrito receptor de complemento CR1g,

codificado pelo gene *VSIG4* também apresenta características de se ligar a patógenos opsonizados por C3 mediando a sua fagocitose. O CRIg é expresso em macrófagos, pele e tecido nervoso periférico, e poderia portanto estar envolvido no reconhecimento do *M. leprae* (LONSDALE et. al., 2013).

Este é primeiro estudo investigando uma possível associação de polimorfismos do gene *VSIG4*, com uma doença. Neste estudo pioneiro, foram investigadas duas populações geneticamente distintas de pacientes com hanseníase e controles provenientes de Curitiba-PR e Sinop-MT. As associações com hanseníase encontradas em Curitiba e replicadas em Sinop demonstram um resultado consistente.

Foram genotipados seis SNPs, dos quais quatro são marcadores de blocos haplotípicos do gene *VSIG4*, (em negrito): dois localizados no promotor (rs2284705, **rs5964489**), um no intron 1 (**rs5964488**), um no exon 2 (rs34581041) e outro no intron 3 (**rs5964487**, **rs9887348**).

As frequências dos SNPs obtidas foram comparadas aos do projeto 1000 Genomes. Houve homogeneidade na distribuição das frequências dos alelos entre os grupos de eurodescendentes e entre os de afrodescendentes, investigados no presente trabalho e no Projeto 1000 Genomes (THE 1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM, 2012).

A partir dos seis SNPs genotipados, foram construídos nove haplótipos de acordo com a frequência dos mesmos, observada por PCR-SSP. Os haplótipos mais frequentes nas populações de Curitiba e Sinop foram **2B2 (TGACTA)*, **1 (TCGCCG)* e **2B (TGGCCG)*. Até o momento, as frequências destes haplótipos não haviam sido investigadas em estudo de genética de populações.

A sequência de passos mutacionais dos haplótipos do gene *VSIG4* foi baseada supondo-se o haplótipo **1 (TCGCCG)* como ancestral africano – uma vez que os alelos deste haplótipo são os mais comuns nas populações africanas investigadas, originado os haplótipos **2B (TGGCCG)*, *TGGCTA*, **2B2 (TGACTA)* e *TCGTCG*. Os haplótipos **1.2B2A (TCGCTA)* e **2B2.1 (TGACCG)* provavelmente foram formados após a recombinação gênica entre os haplótipos comuns **2B2 (TGACTA)* e **1 (TCGCCG)*. A mais provável origem do haplótipo **2B2.1 (TGACCG)* também parece ser decorrente de recombinação gênica, ao invés de mutação recorrente.

O haplótipo mais comum **2B2 (TGACTA)* foi associado com proteção à hanseníase na população total (homens e mulheres) de Curitiba (OR=0,52 [IC95%=0,28-0,96], P=0,038) e de Sinop (OR=0,47 [IC95%=0,26-0,85], P=0,012). Esse efeito protetor se repetiu em homens (OR=0,43 [IC95%=0,21-0,88], P=0,022) e homens jovens (18 a 40 anos) (OR=0,21 [IC95%=0,06-0,66], P=0,008) de Curitiba e, em mulheres (OR=0,26 [IC95%=0,10-0,67], P=0,006), mulheres com mais de 40 anos (OR=0,2 [IC95%=0,05-0,76], P=0,019) de Sinop. Nos pacientes de Sinop a associação protetora ocorreu como uma tendência na forma clínica virchowiana (OR=0,46 [IC95%=0,19-1,10], P=0,082). Os resultados discrepantes observados entre os subgrupos divididos por sexo e faixa etária, de Curitiba e Sinop, devem-se a um possível viés no tamanho amostral, e não a uma associação restrita a um dos sexos ou a uma certa faixa etária. Portanto, esse efeito ainda deve ser confirmado por aumento da amostragem. Entretanto, considerando-se a população total dos pacientes, conclui-se que o haplótipo **2B2 (TGACTA)* está associado com proteção à hanseníase tanto no Sul, quanto no Centro-Oeste brasileiro.

Houve uma tendência para associação entre o haplótipo **2B (TGGCCG)* com suscetibilidade à hanseníase em Curitiba (OR=2,52 [IC95%=0,95-6,62], P=0,061) e Sinop (OR=1,6 [IC95%=0,98-2,61], P=0,060). Essa tendência foi confirmada em homens de Curitiba (OR=4,8 [IC95%=0,90-26,06], P=0,066). Em mulheres (OR=3,69 [IC95%=1,48-9,20], P=0,005) e mulheres com mais de 40 anos (OR=3,86 [IC95%=1,29-11,52], P=0,015) de Sinop foi confirmada, de fato, associação com suscetibilidade à hanseníase. O mesmo tipo de associação foi observada em Curitiba, ao analisar-se indivíduos portando **2B (TGGCCG)*, mas não **2B2 (TGACTA)* (OR=4,81 [IC95%=1,04-22,25], P=0,045), hemizigotos e homozigotas **2B (TGGCCG)* ou **1 (TCGCCG)* e heterozigotas compostas **2B (TGGCCG)/*1 (TCGCCG)* (OR=5,57 [IC95%=1,15-27,06], P=0,033), e apenas homens com **1 (TCGCCG)* ou **2B (TGGCCG)* (OR=2,17 [IC95%=1,11-4,24], P=0,024), especialmente homens jovens (OR=3,42 [IC95%=1,05-11,13], P=0,041). Esses dois últimos haplótipos, que diferem apenas na posição -685 do promotor, também foram associados com a forma clínica virchowiana em Sinop (OR=2,65 [IC95%=1,05-6,69], P=0,038). Novamente, os resultados discrepantes observados entre os subgrupos divididos por sexo e faixa etária, de Curitiba e Sinop, provavelmente devem-se a um viés amostral. Avaliando-se esses resultados em conjunto, é possível sugerir que hemizigotos, homozigotas e heterozigotas

compostas, portando os haplótipos *2B (TGGCCG) e *1 (TCGCCG), apresentam um aumento de dois a quatro vezes no risco de desenvolvimento de hanseníase, tanto no Sul, quanto no Centro-Oeste brasileiros.

A associação propriamente dita se deu com os polimorfismos investigados no intron 1 (g.11199A>G) e no intron 3 (g.15364T>C ; g.16029A>G), que ocorrem em forte desequilíbrio de ligação, fato que dificulta a identificação do alelo causal. A associação protetora ocorreu com ATA, e a de suscetibilidade com GCG. Os SNPs destes haplótipos emolduram o exon 3 alternativo, que codifica o domínio IgC2 presente nas variantes *VSIG4-001* e *VSIG4-201*.

VSIG4, assim como a maioria dos genes de eucariotos é transcrito como precursor contendo longos seguimentos de introns que são removidos no processamento do pré-mRNA para a produção do mRNA maduro. Os sítios silenciadores de *splicing* de exon (ESS) são reconhecidos por proteínas repressoras que impedem o acesso aos sítios de processamento da sequência, aumentando a probabilidade de que uma determinada sequência seja incluída como exon (WANG et al., 2004). Portanto, é possível que os SNPs associados à doença, estejam interferindo na regulação do processamento alternativo do pré-mRNA, aumentando a produção de um tipo de isoforma, em detrimento de outro. De fato, por meio de análise *in silico*, observamos que o alelo C do SNP rs5964487 e o alelo G do SNP rs9887348, ambos no intron 3, provavelmente anulam o reconhecimento de um sítio de processamento do pré-mRNA. Se um ESS é destruído, caso da mutação CG no intron 3, aumenta a probabilidade de que o exon 3 seja tratado como intron e não seja incluído no mRNA maduro (DESMET et al., 2009). De fato, há indícios que a substituição T>C na posição +10.234 (rs5964487) do gene *VSIG4*, altera significativamente o reconhecimento deste sítio pela proteína repressora Yin Yang 1 (YY1), afetando a remoção do intron 3 (BIANCHI et al., 2013; WARD; KELLIS, 2012). Não há destruição de ESS para o SNP investigado no intron 1, e possivelmente, a associação encontrada ATA e CGC sugere que a associação com o rs5964488 deve-se a um efeito carona com os SNPs do intron 3. É provável que o TA promova a inclusão do exon 3 e, o GC, a exclusão. Portanto, é possível que as isoformas com o domínio IgC2, codificadas pelas variantes gênicas *VSIG4-001* e *VSIG4-201*, tenham efeito protetor na hanseníase, e que a isoforma principal *VSIG4-003*, aumente a suscetibilidade a doença.

A variante *VSIG4-201* codifica uma proteína CRIg contendo 321 aminoácidos com uma região C-terminal mais curta em relação à variante *VSIG4-001* (CRIg-L, 399 aa), decorrente da não tradução do exon 8. As três variantes *VSIG4-001*, *VSIG4-003* e *VSIG4-201* expressam o domínio IgV do CRIg, enquanto que o domínio IgC2 está presente nas isoformas *VSIG4-001* e *VSIG4-201*, mas ausente na isoforma principal *VSIG4-003*. O domínio IgV tem a função de reconhecimento do patógeno opsonizado por C3b, entretanto a função do domínio IgC2 ainda necessita ser esclarecida (CUNNINGHAM et al., 2015; HE et al., 2008; HELMY et al., 2006; WIESMANN et al., 2006). O haplótipo *TA* (intron 3, g.15364T>C ; g.16029A>G), associado com proteção à hanseníase, provavelmente promove a inclusão do domínio IgC2. Embora a função deste domínio ainda não esteja devidamente esclarecida (HELMY et al., 2006; WIESMANN et al., 2006; HE et al., 2008), a presença de IgC2 possivelmente favoreça uma resposta do tipo Th1 e a interação do domínio intracelular do CRIg com o canal intracelular 3 de cloretos (CLIC3), essencial para a eliminação de bactérias intracelulares (KIM et al., 2013). A variante *VSIG4-201* expressa uma proteína com domínio intracelular mais curto devido a não tradução do exon 8, o que poderia interferir nessa interação com o canal CLIC3. Por outro lado, a isoforma principal *VSIG4-003* (CRIg-S), que não expressa IgC2, poderia inibir a produção de IL-2, IFN- γ e diminuir a resposta de células TCD8+, contribuindo para a proliferação do parasita. Estudos complementares devem ser realizados para avaliar os polimorfismos do gene *VSIG4* e seus produtos gênicos, incluindo o exon 8, na tentativa de elucidar os mecanismos intracelulares envolvidos na eliminação do *M. leprae*.

A substituição do aminoácido arginina por triptofano na posição 108 da proteína CRIg (R108W), devido o polimorfismo rs34581041 no exon 2, é potencialmente deletéria, afetando a função da isoforma *VSIG4-003* (KUMAR et al., 2009). No presente estudo, este polimorfismo foi observado em heterozigotos controles (0,5%) e pacientes (0,9%) euro-brasileiros da Região Sul, porém não foi associado com hanseníase.

Boldt e colaboradores (2013b) demonstraram que o haplótipo *FCN1*3C1* do gene *FCN1* está associado com proteção à hanseníase (OR= 0,243 [IC95%= 0,083-0,71], P = 0,003), similar ao observado com o haplótipo *FCN2*AGA* do gene *FCN2* (OR=0,13 [IC95%=0,03-0,43], P<0,001) (MESSIAS-REASON et al., 2009). As associações encontradas com o gene *VSIG4*, após correção pela presença/ausência

do polimorfismo *FCN1*3C1* do gene *FCN1*, permaneceram com uma tendência, enquanto a associação protetora de *FCN1*3C1* foi perdida. Esse efeito foi observado com **2B (TGGCCG)* e ausência de **2B2 (TGACTA)* (OR=4,73 [IC95%=0,97-23,01], P=0,054 versus *FCN1*3C1*, P=0,373), com **2B (TGGCCG)* e/ou **1 (TCGCCG)* (OR= 1,79 [IC95%=0,93-3,43], P=0,079 versus *FCN1*3C1* P=0,301), e com o efeito protetor de **2B2 (TGACTA)* (OR= 0,58 [IC95%=0,31-1,09], P=0,093 versus *FCN1*3C1*, P=0,313).

As associações encontradas com o gene *VSIG4*, após correção pela presença/ausência do polimorfismo *FCN2*AGA* do gene *FCN2*, demonstraram uma associação independente. Esse efeito foi observado com o haplótipos associados com suscetibilidade **2B (TGGCCG)* excluindo mulheres com **2B2 (TGACTA)* (OR=14,1 [IC95%=1,6-124,4], P=0,017 versus *FCN2*AGA*, OR=0,16 [IC95%=0,04-0,66], P=0,011), **2B (TGGCCG)* (OR=4,13 [IC95%=1,23-13,8], P=0,021 versus *FCN2*AGA*, OR=0,20 [IC95%=0,06-0,73], P=0,015), e **2B (TGGCCG)* e/ou **1 (TCGCCG)* (OR=3,43 [IC95%=1,53-7,68], P=0,003 versus *FCN2*AGA* P=0,009). Não foi observada associação entre os haplótipos **2B2 (TGACTA)* e *FCN2*AGA*. Estes resultados sugerem que os efeitos de suscetibilidade dos haplótipos **2B (TGGCCG)/*1 (TCGCCG)*, e de proteção do haplótipo **2B2 (TGACTA)*, sobrepõem-se ao efeito protetor do *FCN1*3C1*. Por outro lado, as associações de suscetibilidade dos polimorfismos de *VSIG4* são independentes do efeito protetor de *FCN2*AGA*.

A associação da hanseníase com coinfeção pelo HBV foi demonstrada anteriormente (P=0,017) (revisado por LEITÃO et al., 2014). Neste estudo os genótipos de *VSIG4* **2B (TGGCCG)*, mas sem **2B2 (TGACTA)* (OR=14,2 [IC95%=3,70-54,41], P <0,001), presença/ausência de *TGGCGC*, considerando todos os controles como HBV negativos (OR=4,61 [IC95%=1,74-12,21], P=0,002), e *TGCGGC* ou **1 (TCGCCG)* (OR=2,76 [IC95%=1,37-5,59], P=0,005), foram associados com suscetibilidade à coinfeção hanseníase e hepatite B. Foi observada associação protetora com o haplótipo **2B2 (TGACTA)* e coinfeção hanseníase e hepatite B (OR=0,40 [IC95%=0,2-0,81], P=0,011). Um estudo realizado em pacientes com hepatite B crônica demonstrou que as células T mantém sua função antiviral contra o HBV pela diminuição da expressão do CRIg (GUO et al., 2010). Portanto, é possível que os polimorfismos de *VSIG4* associados com

proteção contra a hanseníase, possam alterar a expressão do CRlg em macrófagos, protegendo também contra a coinfeção pelo vírus HBV.

Concluindo, o presente estudo é o primeiro a avaliar os polimorfismos de *VSIG4* e associação com doenças. Os haplótipos *ATA* e *GCG* do gene *VSIG4* estão associados respectivamente, com proteção e suscetibilidade à hanseníase e coinfeção hanseníase-hepatite B, independentemente de polimorfismos previamente associados ao gene *FCN2*, cujo produto é capaz de iniciar a cascata do complemento e causar a opsonização da micobactéria. Estudos complementares com maior número de indivíduos, dos polimorfismos estudados e seus produtos gênicos, incluindo as formas variantes de CRlg, devem elucidar as diferenças entre as populações estudadas e a importância do gene *VSIG4* na hanseníase, o que poderá contribuir para estratégias de prevenção e tratamento da doença.

6 CONCLUSÕES

- As técnicas de tipagens por PCR-SSP foram otimizadas com sucesso para a pesquisa dos SNPs na região promotora, intron 1, exon 2 e intron 3 do gene *VSIG4*;
- A distribuição dos SNPs é homogênea com a observada na população europeia;
- Dentre os nove haplótipos identificados, *VSIG4*1* (TCGCCG) é provavelmente o ancestral, sendo que quatro passos mutacionais originaram os haplótipos mais comuns e recombinações gênicas originaram os haplótipos raros;
- A associação ocorreu com os polimorfismos investigados no intron 1 (*g.11199A>G*) e no intron 3 (*g.15364T>C*; *g.16029A>G*), que ocorrem em forte desequilíbrio de ligação. A associação protetora ocorreu com *ATA*, e houve tendência à suscetibilidade com *GCG*;
- Essa associação foi replicada em Sinop-MT. Nesta população também houve associação similar com a forma clínica virchowiana;
- É provável que o *TA* (intron 3, *g.15364T>C*; *g.16029A>G*) promova a inclusão do exon 3 e, o *GC*, a exclusão, sugerindo que as isoformas com o *IgC2*, *VSIG4-001* e *VSIG4-201*, tenham efeito protetor na hanseníase, e a isoforma principal *VSIG4-003*, aumente a suscetibilidade;
- Os efeitos de suscetibilidade dos haplótipos **2B* (TGGCCG) e **1* (TCGCCG), e de proteção do haplótipo **2B2* (TGACTA), sobrepõem-se ao efeito protetor do *FCN1*3C1*;
- As associações de suscetibilidade dos polimorfismos de *VSIG4* são independentes do efeito protetor de *FCN2*AGA*;
- Os haplótipos **2B* (TGGCCG) excluindo mulheres com **2B2* (TGACTA), e **2B* (TGGCCG) ou **1* (TCGCCG), foram associados com suscetibilidade e o haplótipo **2B2* (TGACTA) com proteção à coinfeção hanseníase e HBV;
- Esses resultados sugerem que polimorfismos de *VSIG4*, bem como suas isoformas, influenciam a suscetibilidade à infecção pelo *M. leprae* e coinfeção pelo vírus HBV.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- ALTER, A., HUONG, N.T, SINGH, M, et al. Human leukocyte antigen class I region single-nucleotide polymorphisms are associated with leprosy susceptibility in Vietnam and India. **J Infect Dis**. 2011;203:1274-1281.
- BAKKER, M. I.; HATTA, M.; KWENANG, A.; et al. Risk factors for developing leprosy--a population-based cohort study in Indonesia. **Leprosy review**, v. 77, n. 1, p. 48–61, 2006.
- BARBIERE, C.L.A.; MARQUES, H.H.S. Hanseníase em crianças e adolescentes: revisão bibliográfica e situação no Brasil. **Pediatria (São Paulo)**, v. 31, n. 4, p. 281-290, 2009.
- BARRETT, J.C.; FRY, B.; MALLER, J.; DALY, M.J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**. 2005 Jan 15 [PubMed ID: 15297300]
- BELTRAME, M. H.; CATARINO, S. J.; GOELDNER, I.; BOLDT, A. B. W.; DE MESSIAS-REASON, I. J. The Lectin Pathway of Complement and Rheumatic Heart Disease. **Frontiers in Pediatrics**, v. 2, 2015a.
- BELTRAME, M. H.; BOLDT, A. B. W.; CATARINO, S. J.; et al. MBL-associated serine proteases (MASPs) and infectious diseases. **Molecular Immunology**, v. 3, p. 1–16, 2015b.
- BEIGUELMANN, B. **Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994.
- BIANCHI, M.; CRINELLI, R.; GIACOMINI, E.; et al. Yin Yang 1 Intronic Binding Sequences and Splicing Elicit Intron-Mediated Enhancement of Ubiquitin C Gene Expression. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, e65932, p. 1-19, 2013.
- BOCHUD, P.-Y.; HAWN, T. R.; ADEREM, A. Cutting edge: a Toll-like receptor 2 polymorphism that is associated with lepromatous leprosy is unable to mediate mycobacterial signaling. **Journal of immunology**, v. 170, n. 7, p. 3451–3454, 2003.
- BOLDT, A. B. W.; GOELDNER, I.; STAHLKE, E. R. S.; et al. Leprosy Association with Low MASP-2 Levels Generated by MASP2 Haplotypes and Polymorphisms Flanking MAP19 Exon 5. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 2013a.
- BOLDT, A. B. W.; SANCHEZ, M. I. N.; STAHLKE, E. R. S.; et al. Susceptibility to leprosy is associated with M-ficolin polymorphisms. **Journal of Clinical Immunology**, v. 33, n. 1, p. 210–219, 2013b.

- BONAR, A.; CHMIELA, M.; RUDNICKA, W.; RÓZALSKA, B. Mannose-binding lectin enhances the attachment and phagocytosis of mycobacteria *in vitro*. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 53, n.5, p.437-441, 2005.
- BRAGA, A. C.M.; REASON, I. J. M.; MALUF, E. C. P.; VIEIRA, E. R. Leprosy and confinement due to leprosy show high association with hepatitis C in Southern Brazil. **Acta Tropica**, v. 97, n. 1, p. 88–93, 2006.
- BRASIL. Lei n. 9.010, de 29 de março de 1995. **Dispõe sobre a terminologia oficial relativa à hanseníase e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 30 mar. 1995, seção 1, p. 4509.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Controle da hanseníase: uma proposta de integração ensino-serviço**. Rio de Janeiro: DNDS/NUTES, 1989.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia para o Controle da hanseníase**. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Hepatites virais: o Brasil está atento**. 3.ed. Brasília, Ministério da Saúde, 2008. 60p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da hanseníase, 2014. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/rio/705-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/hansenia/11298-situacao-epidemiologica-dados>. <acesso em 05/04/15).
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Imunizações – PNI. Nota técnica nº 02/2013: ampliação da oferta da vacina da hepatite B para a faixa etária de 30 a 49 anos de 2013. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.
- CAMPAGNE, M.L.; WIESMANN, C; BROWN, E.J. Macrophage complement receptors and pathogen clearance. **Cellular Microbiology**. v. 9, n. 9, p. 2095-2102, 2007.
- CARDOSO, C.C, PEREIRA, A.C., MARQUES, C.S. et al. Leprosy susceptibility: Genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. **Future Microbiol**. v. 6:533-549, 2011.
- CASANOVA, J.L., ABEL, L. Inborn errors of immunity to infection: The rule rather than the exception. **J Exp Med**. v. 202:197-201, 2005.
- CASTRO, E. A. **O leprosário São Roque e a modernidade: Uma abordagem da Hanseníase na perspectiva da relação Espaço-Tempo**. 135 p. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Geografia). Departamento de Geografia, Setor de Ciências da Terra da Universidade Federal do Paraná, 2005.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC. Curso sorológico da hepatite B. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/hepatitis/HBV/index.htm> >. Acesso em 10/10/2014).

CHAPMAN, S.J., HILL, A.V. Human genetic susceptibility to infectious disease. **Nat Rev Genet.** 2012;13:175-188.

CHOPRA R, ALI S, SRIVASTAVA AK, AGGARWAL S, KUMAR B, et al. Mapping of PARK2 and PACRG Overlapping Regulatory Region Reveals LD Structure and Functional Variants in Association with Leprosy in Unrelated Indian Population Groups. **PLoS Genet**, v. 9, n. 7, p. e1003578, 2013.

CHOPRA, R., KALAIARASAN, P.; SHAFAT, A.; SRIVASTAVA, A.M.; AGGARWAL, S.; GARG, V.K.; BHATTACHARYA, S.N.; RAMESHWAR, N.K.; BAMEZAI, R.N.K. PARK2 and proinflammatory/anti-inflammatory cytokine gene interactions contribute to the susceptibility to leprosy: a case–control study of North Indian population. **BMJ**, v. 4, p. 1-7, 2014.

CUNNINGHAM, F.; AMODE, M.R., BEAL, D.B.K. et al. **Ensembl 2015 Nucleic Acids Research** 2015 43 Database issue:D662-D669. Disponível em: < http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=X:66033064-6034064> Acesso 14/04/2015).

DAGUR, P. K.; SHARMA, B.; KUMAR, G.; et al. Mycobacterial antigen(s) induce anergy by altering TCR- and TCR/CD28-induced signalling events: insights into T-cell unresponsiveness in leprosy. **Molecular immunology**, v. 47, n. 5, p. 943–52, 2010.

DESMET, F. O.; HAMROUN, D.; LALANDE, M.; et al. Human Splicing Finder: An online bioinformatics tool to predict splicing signals. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 9, p. 1–14, 2009.

DOCKRELL, H.M.; YOUNG, S.K.; BRITTON, K.; RIVOIRE, B. Induction of Th1 cytokine responses by mycobacterial antigens in leprosy. **Infection and immunity**, p. 4385-4389, 1996.

DORNELLES, L. N.; PEREIRA-FERRARI, L.; MESSIAS-REASON, I.J.T. Mannan-binding lectin plasma levels in leprosy: deficiency confers protection against lepromatous but not tuberculoid form. **Clinical and Experimental Immunology**, v.145, p. 463-468, 2006.

EIDT, L.M. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. Trajectory in the Brazilian Public Health. **Saúde e Sociedade** v.13, n.2, p.76-88, 2004.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular ecology resources**, v. 10, n. 3, p. 564–7, 2010.

FITNESS, J.; FLOYD, S.; WARNDORFF, D. K.; et al. Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. **Am J Trop Med**, v. 71, n. 3, p. 330–340, 2004.

FUJITA T, MATSUSHITA M, ENDO Y: The lectin-complement pathway - its role in innate immunity and evolution. **Immunol Rev**, v.198, p.185-202, 2014.

FUKUTOMI, Y.; MAEDA, Y.; MATSUOKA, M.; MAKINO, M. Temperature dependency for survival of *Mycobacterium leprae* in macrophages. **Japanese Journal of Leprosy**, v. 78, n. 1, p. 7–16, 2009.

GARIBYAN, L.; AVASHIA, N. Polymerase chain reaction. **The Journal of Investigative Dermatology**, 2013.

GEÇA, A.; GOLA, J.; DUDEK, S.; JASIK, K.; MUC-WIERZGON, M.; NOWAKOWSKA-ZAJDEL, E.; NIEDWOROK, E.; MAZUREK, U. Expression of genes associated with H factor in fibroblasts infected with *Borrelia spirochaetes*. **Scand J Immunol.**,v.76, n.4, p.354-8, 2012.

GELBER, R.H. **Leprosy (Hansen's disease)**. In: FAUCI, A.S. et al. Harrison's principles of internal medicine. 17.ed. 2008. Disponível em: <<http://www.accessmedicine.com/content.aspx?alD=2873080>>.

GERSUK, G.; HIRAOKA, A.; MARR, K.A. Human monocytes differentiate into macrophages under the influence of human KPB-M15 conditioned medium. **J Immunol Methods**. v. 299; n. 1-2; p. 99-106, 2005.

GIASSON, B. I.; LEE, V. M. Parkin and the molecular pathways of Parkinson's disease. **Neuron**, v.31, p. 885-891, 2001.

GORGANI, N.N.; HE, J.Q.; KATSCHKE JR, K.J.; HELMY, K.Y.; XI, H.; STEFFEK M.; HASS, P.E.; van LOOKEREN, C.M. Complement receptor of the Ig superfamily enhances complement-mediated phagocytosis in a subpopulation of tissue resident macrophages. **J Immunol**. v. 181, n. 11, p.7902-7808, 2008.

GUO, S.; THOMPSON, E. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles.**Biometrics**, v. 48, p. 361-372, 1992.

GUO, S.; YANG, C.; MEI, F.; et al. Down-regulation of Z39Ig on macrophages by IFN-gamma in patients with chronic HBV infection. **Clinical immunology (Orlando, Fla.)**, v. 136, n. 2, p. 282–91, 2010.

HAGGE, D.A, SAUNDERS, B.M, EBENEZER, G.J, et al. Lymphotoxin-alpha and TNF have essential but independent roles in the evolution of the granulomatous response in experimental leprosy. **Am J Pathol**, v.174, p.1379-1389, 2009.

HELMY, K. Y.; KATSCHKE, K. J. Jr.; GORGANI, N. N. et al. CRIg: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. **Cell**, v. 124, p. 915–927, 2006.

HSIEH CS, HEIMBERGER AB, GOLD JS, et al. Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.89, p:6065-6069, 1992.

HE, J. Q.; WIESMANN, C.; VAN LOOKEREN CAMPAGNE, M. A role of macrophage complement receptor CR1g in immune clearance and inflammation. **Molecular immunology**, v. 45, n. 16, p. 4041–7, 2008.

IMAI, Y.; MURAKAMI, S.M.; SHOJI, T.; ABE, M.; TAKAHASHI, K. A product of the human gene adjacent to parkin is a component of Lewy bodies and suppresses Pael receptor-induced cell death. **J. Biol. Chem.** 278, 51901–51910 (2003).

IP, W. K. E.; TAKAHASHI, K.; MOORE, K. J.; STUART, L. M.; EZEKOWITZ, R. A. B. Mannose-binding lectin enhances Toll-like receptors 2 and 6 signaling from the phagosome. **JEM**, v. 205, n. 1, p. 169–181, 2008.

ISHIDA H, HASTINGS R, THOMPSON-SNIPES L, et al. Modified immunologic status of anti-IL-10 treated mice. **Cell Immunol.** v.148:371, 1993.

JAIN, S.; REDDY, R. G.; OSMANI, S. N.; LOCKWOOD, D. N. J.; SUNEETHA, S. Childhood leprosy in an urban clinic, Hyderabad, India: clinical presentation and the role of household contacts. **Leprosy review**, v. 73, n. 3, p. 248–253, 2002.

JOB C.K., JAYAKUMAR J., KEARNEY M., GILLIS T.P. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. **Am J Trop Med Hyg**; v. 78: 518–21, 2008.

KATSCHKE JR, K.J. et al. A novel inhibitor of the alternative pathway of complement reverses inflammation and bone destruction in experimental arthritis. **JEM**, v. 204, n. 6, p. 1319–1325, 2007.

KIM, D. D.; MIWA, T.; KIMURA, Y. et al. Deficiency of decay-accelerating factor and complement receptor 1-related gene/protein y on murine platelets leads to complement-dependent clearance by the macrophage phagocytic receptor CR1g. **Blood**, v. 112, n. 4, p. 1109–1119, 2008.

KIM, K. H.; CHOI, B. K.; SONG, K. M.; et al. CR1g signals induce anti-intracellular bacterial phagosome activity in a chloride intracellular channel 3-dependent manner. **European journal of immunology**, v. 43, n. 3, p. 667–78, 2013.

KORBIE, D. J.; MATTICK, J. S. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. **Nat. Protocols**, v. 3, n. 9, p. 1452–1456, 2008.

KUHN, R.; LOHLER, J.; RENNICK D; et al. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. **Cell.** v. 75:263-274, 1993.

KUMAR, P; HENIKOFF, S; NG, PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. **Nature Protocols**, 4(8):1073-1081, 2009.

LANGNAESE, K.; COLLEAUX, L.; KLOSS, D.U.; FONTES, M.; WIEACKER, P. Cloning of Z39lg, a novel gene with immunoglobulin-like domains located on human chromossom X. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1492, p. 522–525, 2000.

LEITÃO, C.; UEDA, D.; DE MORAES BRAGA, A. C.; BOLDT, A. B. W.; MESSIAS-REASON, I. J. T. Leprosy and hepatitis B coinfection in southern Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 8–12, 2014.

LI, J.; LIU, H.; LIU, J.; FU, X.; YU, Y.; et al. Association study of the single nucleotide polymorphisms of PARK2 and PACRG with leprosy susceptibility in Chinese population. **Eur J Hum Genet**, v.20, p.488–489, 2012.

LIAO, Y.; GUO, S.; CHEN, Y.; CAO, D.; XU, H.; YANG, C.; FEI, L.; NI, B.; RUAN, Z. VSIG4 expression on macrophages facilitates lung cancer development. **Laboratory Investigation** 94, 706-715, 2014.

LIN, D.Y.; HU, Y.; HUANG, B.E. Simple and efficient analysis of disease association with missing genotype data. **The American Journal of Human Genetics**, 82:444-45, 2008.

LIMA, M.C.; PEREIRA, G.M.; RUMJANEK, F.D.; et al. Immunological cytokine correlates of protective immunity and pathogenesis in leprosy. **Scand J Immunol** v. 51:419–28, 2000.

LISZEWSKI, K.; ATKINSON, J.P. Exploring the complement system in human disease: novel disease associations revealed by whole genome screens. **The Reumatologist**. v. 4, n. 2, p.15-23, 2010.

LONSDALE, J.; THOMAS, J.; SALVATORE, M.; et al. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. **Nat Genet**, v. 45, n. 6, p. 580–585, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ng.2653>>.

MALHOTRA, D.; DARVISHI, K.; SOOD, S.; et al. IL-10 promoter single nucleotide polymorphisms are significantly associated with resistance to leprosy. **Human Genetics**, v. 118, n. 2, p. 295–300, 2005.

MALHOTRA, D.; DARVISHI, K.; LOHRA, M.; et al. Association study of major risk single nucleotide polymorphisms in the common regulatory region of PARK2 and PACRG genes with leprosy in an Indian population. **EJHG**, v. 14, n. 4, p. 438–442, 2006.

MANRY J, QUINTANA-MURCI L. A genome-wide perspective of human diversity and its implications in infectious disease. **Cold Spring Harb Perspect Med.**;3:a012450, 2013.

MESSIAS-REASON, I.J.; BOLDT, A.B.W.; BRAGA, A.C.M.; STAHLKE, E..R.S.; DORNELLES, L.; PEREIRA-FERRARI, L.; KREMSNER, P.G.; KUN, J.F.J. The association between mannan-binding lectin gene polymorphism and clinical leprosy: new insight into an old paradigm. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 196, p. 1379-1385, 2007.

MESSIAS-REASON, I.J.; KREMSNER, P.G.; KUN, J.F.J. Functional haplotypes producing normal Ficolin-2 protect against clinical leprosy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, p. 801-804, 2009.

MISCH, E.A; BERRINGTON, W.R.; VARY, J.C.; HAWN, T.R. Leprosy and the human genome. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 74, n. 4, p. 589–620, 2010.

MIRA, M.T.; ALCAÏS, A.; VAN THUC, N.; et al. Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. **Nature genetics**, v. 33, n. 3, p. 412–415, 2003.

MIRA, M.T.; ALCAI, A.; MORAES, M.O.; et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. **Nature**, v. 427, n. February, p. 636–640, 2004.

MIRA, M.T. Genetic host resistance and susceptibility to leprosy. **Microbes Infect.**; v.8:1124-1131, 2006.

MODLIN, R.L. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. **J Invest Dermatol.** n. 102, p. 828-832, 1994.

MORAES M.O.; PACHECO, A.G.; SCHONKEREN, J.J.; et al. Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. *Genes Immun.* v.5: 592-595, 2004.

MORSCIO, J.; DIERICKX, D.; FERREIRO, J.F.; HERREMAN, A.; VAN LOO, P.; BITTOUN, E.; VERHOEF, G.; MATTHYS, P.; COOLS, J.; WLODARSKA, I.; DE WOLF-PEETERS, C.; SAGAERT, X.; TOUSSEYN, T. Gene expression profiling reveals clear differences between EBV-positive and EBV-negative posttransplant lymphoproliferative disorders. **Am J Transplant.** May;13(5):1305-16, 2013.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. .ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MURRAY, R.A.; SIDDIQUI, M.R.; MENDILLO, M.; KRAHENBUHL, J.; KAPLAN, G. *Mycobacterium leprae* inhibits dendritic cell activation and maturation. **The Journal of Immunology**. v. 178, p. 338-344, 2007.

NEBERT, D.W. Proposal for an allele nomenclature system based on the evolutionary divergence of haplotypes. **Hum Mutat.** , v.20, p. 463–72, 2002.

Ng, V.; ZANAZZI, G.; TIMPL, R.; et al. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. **Cell**, v. 103, n. 3, p. 511–524, 2000.

O PROBLEMA DA LEPRA RESOLVIDO NO PARANÁ. **Gazeta do Povo**, Curitiba, 21 de outubro de 1926.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS. Technical report series. **Chemotherapy of leprosy for control programmes**. n. 675. Suíça, 1982.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS. **Weekly epidemiological record.** n.36 (89), p.389-400. Suíça, 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS. Global hepatitis programme. Department of HIV/AIDS. **Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection.** France, 2015.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde. Paraná está próximo de eliminar a hanseníase como problema de saúde pública. Postado em 23/11/2014. Disponível em: <<http://www.saude.pr.gov.br/modules/noticias/article.php?storyid=3862>>. Acesso em: 05/04/15.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde. Coordenação estadual do programa de controle da hanseníase. Serviço de atenção integral em hanseníase: diretrizes para serviços de referências, 2014. Disponível em: <http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/OOFICINA_2_COMSUS/apresentacao_hansenase.pdf>. Acesso em: 05/04/2015.

PEREIRA, A.C.; BRITO-DE-SOUZA, V.N.; CARDOSO, C.C.; et al. Genetic, epidemiologic and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for -819 C/T in leprosy susceptibility. **Genes Immun**, 10:174-180, 2009.

PESSOLANI, M.C.V. Immunological Cytokine Correlates of Protective Immunity and Pathogenesis in Leprosy. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.51, n.4, p. 419–428, 2000.

PETTIGREW, H. D.; TEUBER, S. S.; GERSHWIN, M. E. Clinical significance of complement deficiencies. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1173, p. 108–23, 2009.

PETERS, E. S.; ESHIET, A L. Male-female (sex) differences in leprosy patients in south eastern Nigeria: females present late for diagnosis and treatment and have higher rates of deformity. **Leprosy review**, v. 73, n. 3, p. 262–267, 2002.

PREVEDELLO, F. C.; MIRA, M. T. Leprosy : a genetic disease ? **An Bras Dermatol.** v. 82, n. 5, p.451-9, 2007.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. An exact test for population differentiation. **Evolution**, v. 49, p. 1280-1283, 1995.

RENAULT, C.A.; ERNST, J.D. Mycobacterium leprae. In: **Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases.** 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2010. p. 3165-76.

REN, Y.; DING, Q.; ZHANG, X. Ficolins and infectious diseases. **Virologica Sinica**, v. 29, n. 1, p. 25–32, 2014.

RIDLEY, D.S.; JOPLING, M.J. Classification of leprosy according to immunity. A five group system. **Int J Lepr.** v. 34, p. 255-73, 1966.

ROACH, D.R.; BRISCOE, H.; SAUNDERS, B.; et al. Secreted lymphotoxin-alpha is essential for the control of an intracellular bacterial infection. **J Exp Med.** 2001;193:239-246.

RODRIGUES L.C.; LOCKWOOD, D.N.J. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. **Lancet Infect Dis.** v.11:464-70, 2011.

ROOZENDAAL, R.; CARROLL, M. C. Emerging patterns in complement-mediated pathogen recognition. **Cell**, v. 125, n. 1, p. 29–32, 2006.

SANTOS AR, SUFFYS PN, VANDERBORGHT PR, et al. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. **J Infect Dis.** v.186, p.1687-1691, 2002.

SAPKOTA BR, MACDONALD M, BERRINGTON WR, et al. Association of TNF, MBL, and VDR polymorphisms with leprosy phenotypes. **Hum. Immunol.** v. 71, p.992-998, 2010.

SAUER, M.D.; SALOMÃO, H.; RAMOS,G.B.; D'ESPINDULA,H.D.R; RODRIGUES, R.S.A.; MACEDO, W.C.; SINDEAUX, R.H.M., MIRA, M.T. Genetics of leprosy: Expected and unexpected developments and perspectives. **Clinics in Dermatology** v. 33, p.99–107, 2015.

SCHLESINGER, L.S.; HORWITZ, M.A. Phagocytosis of leprosy bacilli is mediated by complement receptors CR1 and CR3 on human monocytes and complement C3 in serum. **J.Exp.Med.** v. 174, p.1031-1038, 1991.

SCHLESINGER, L.S.; HORWITZ, M.A. Phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae* binds complement component C3 in serum and mediates phagocytosis by human monocytes. **JCI.** v. 85, p. 1304-1314, 1990.

SCHOREY, J. S.; LI, Q.; COURT, D. W. M. C.; et al. A *Mycobacterium leprae* Gene Encoding a Fibronectin Binding Protein Is Used for Efficient Invasion of Epithelial Cells and Schwann Cells. **Infection and Immunity** , v. 63, n. 7, p. 2652–2657, 1995.

SCHURR, E.;ALCAIS A.; DE LESELEUC L.;et al. Genetic predisposition to leprosy: A major gene reveals novel pathways of immunity to *Mycobacterium leprae*. **Semin Immunol.** v.18, p.404-410, 2006.

SERVIÇO NACIONAL DE LEPRO. **Tratado de Leprologia.** Volume I. Rio de Janeiro, 1950.

SHANKARKUMAR, U. HLA associations in leprosy patients from Mumbai, India. **Leprosy review**, v. 75, n. 1, p. 79–85, 2004.

SOUZA, C.S. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. **Medicina, Ribeirão Preto.** v. 30, p. 325-334, 1997.

STURTZ, L.A.; DEYARMIN, B.; VAN LAAR, R.; YARINA, W.; SHRIVER, C.D.; ELLSWORTH, R.E. Gene expression differences in adipose tissue associated with breast tumorigenesis. **Adipocyte**. 1;3(2):107-14, 2014.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Mol Biol Evol**, 1993 , v. 10, n. 3, p. 512-26.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.

TEXTORIS, J.; IVORRA, D.; BEN AMARA, A.; SABATIER, F.; MÉNARD, J.P.; HECKENROTH, H.; BRETTELLE, F.; MEGE, J.L. Evaluation of current and new biomarkers in severe preeclampsia: a microarray approach reveals the VSIG4 gene as a potential blood biomarker. **PLoS One**. Dec 9;8(12):e82638, 2013.

THE 1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. **Nature**, v. 491, n. 7422, p. 56–65, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature11632>>.

THIELENS, N.M., GABORIAUD, C., ARLAUD, G.J. Ficolins: innate immune recognition proteins for danger sensing **Inmunología**. vl. 26 / Núm 3/ Julio-Septiembre: 145-156, 2007.

VASCONCELOS, L. R. S.; FONSECA, J. P. L.; CARMO, R. F. DO; et al. Mannose-binding lectin serum levels in patients with leprosy are influenced by age and MBL2 genotypes. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, p. 551–557, 2011.

VOGT, L. et al. VSIG4, a B7 family–related protein, is a negative regulator of T cell activation **J Clin Invest**., v. 116, n. 10, p. 2817-2826, 2006.

WANG, Z.; ROLISH, M. E.; YEO, G.; et al. Systematic identification and analysis of exonic splicing silencers. **Cell**, v. 119, n. 6, p. 831–845, 2004.

WARD, L. D.; KELLIS, M. HaploReg: A resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. 930–934, 2012.

WIESMANN, C.; K. J. KATSCHKE; J. YIN, K. Y. et al. Structure of C3b in complex with CR1g gives insights into regulation of complement activation. **Nature**, v. 444, p. 217–220, 2006.

YAMANOUCH, A.A.; CARON, C.R.; SHIMAKU, D.T.; et al. Hanseníase e sociedade: um problema sempre atual. **Anais Bras. Dermatol**. v. 6, p.396-404, 1993.

ZANG, X.; ALLISON, J.P. To be or not to be B7. **JCI**. v. 116, n. 10, p. 2590-2593, 2006.

ZHANG, F.R.; HUANG, W.; CHEN, S.-M.; et al. Genomewide association study of leprosy. **The New England journal of medicine**, v. 361, n. 27, p. 2609–2618, 2009.

ZHANG, D.F.; HUANG, X.Q.; WANG, D.; LI, Y.Y., YAO, Y.G. Genetic variants of complement genes Ficolin-2, Mannose-binding lectin and Complement factor H are associated with leprosy in Han Chinese from Southwest China. **Human Genetics**. Volume 132, Issue 6, pp 629-640, 2013.

ANEXOS

ANEXO I – TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA DO SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – UFPR - PARCECER CONSUBSTANCIADO Nº 218.104	104
ANEXO II – TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA DO SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – UFPR - PARCECER CONSUBSTANCIADO Nº 279.970.....	106
ANEXO III – TCLE – PACIENTES	108
ANEXO IV – TCLE - GRUPO CONTROLE	110

ANEXO I – TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA DO SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE – UFPR - PARCECER CONSUBSTANCIADO Nº
218.104

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS-



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência da variabilidade gênica nos receptores de complemento na hanseníase.

Pesquisador: SÉRVIO TÚLIO STINGHEN

Área

Temática

Versão:3

CAAE: 10137212.6.0000.0102

Instituição Proponente: Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 218.104

Data da Relatoria: 13/03/2013

Apresentação do Projeto:

INFLUÊNCIA DA VARIABILIDADE GÊNICA NOS
RECEPTORES DE COMPLEMENTO NA HANSENÍASE

Doutorando: Sérvio Túlio Stinghen

Orientadora: Profa. Dra Iara José de Messias-Reason

Co-orientadora: Dra Angelica Beate Winter Boldt

Trata-se de projeto de pesquisa visando tese de doutorado, no qual os autores pretendem estudar polimorfismos genéticos de receptores para o sistema complemento e associação com a hanseníase

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL - Estudar polimorfismos de uma única base (SNPs) e haplótipos dos genes que codificam os receptores de complemento e verificar sua influência na hanseníase.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: baixo risco relacionado à coleta de sangue venoso periférico, que pode acarretar dor, hematoma e edema. Os pesquisadores informam que em caso de alguma complicação maior, cuidarão para que o paciente seja atendido por profissional de saúde ou, quando necessário, por uma equipe multiprofissional de saúde, sendo o atendimento gratuito.

Benefícios: a compreensão dos mecanismos poderá vir a contribuir para a terapêutica e prevenção dessa doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sendo a hanseníase uma doença importante do ponto de vista da saúde pública, a pesquisa em tela se reveste de relevância. Para o estudo in vitro os autores se propõem a estudar 300 amostras de pacientes com diagnóstico clínico-laboratorial de hanseníase e 300 amostras de doadores voluntários de sangue saudáveis (grupo controle). Os pacientes serão aqueles portadores de hanseníase atendidos no Serviço de Dermatologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

(HC-UFPR) e no Centro Regional de Especialidades Metropolitano - CRE METROPOLITANO. As amostras do grupo controle serão coletadas no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná - HEMEPAR. Os indivíduos das amostras deverão ter idade igual ou superior a 18 anos e serão pareados por sexo e idade. As amostras serão obtidas pela coleta de 5 ml de sangue venoso periférico com anticoagulante etilenodiaminotetracético (EDTA). As amostras dos pacientes com hanseníase serão obtidas no Serviço de Dermatologia do HC e UFPR e no Centro Regional de Especialidades Metropolitano e CRE METROPOLITANO. As amostras do grupo controle serão obtidas no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná e HEMEPAR. Os testes laboratoriais (parte prática) serão realizados no Laboratório de Imunopatologia Molecular do HC e UFPR. Das amostras, serão utilizados os macrófagos para infecção in vitro e análise da expressão e bloqueio dos receptores sob estudo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Constam as anuências dos serviços envolvidos (CRE Metropolitano, Serviço de Dermatologia da UFPR e Hemepar) e demais documentos exigidos por este CEP. A análise de mérito consta da ata de aprovação do projeto em reunião do Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, datada de 2010.

Recomendações:

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências atendidas, o projeto está aprovado.

É obrigatório retirar na secretaria do CEP/SD uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com carimbo onde constará data de aprovação por este CEP/SD, o qual será reproduzido para aplicar junto ao participante da pesquisa. O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa, tanto o participante como o pesquisador deverão rubricar todas as páginas do TCLE, opondo assinaturas na última página do referido Termo (Carta Circular nº. 003/2011 CONEP/CNS);

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Foi anexada a declaração final modelo CONEP, onde o Co participante declara ter lido e concordar com o Parecer deste CEP/SD.

CURITIBA, 13 de Março de 2013

Assinado por:
Claudia Seely
Rocco
(Coordenador)

Endereço: Rua Padre Camargo, 280
Bairro: 2ª andar
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-7259

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

ANEXO II – TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA DO SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – UFPR - PARECER CONSUBSTANCIADO Nº 279.970

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência da variabilidade gênica nos receptores de complemento na hanseníase.

Pesquisador: SÉRVIO TÚLIO STINGHEN

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 10137212.6.0000.0102

Instituição Proponente: Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 279.970

Data da Relatoria: 22/05/2013

Apresentação do Projeto:

Influência da variabilidade gênica nos receptores de complemento na hanseníase.

Pesquisador: Doutorando SÉRVIO TÚLIO STINGHEN.

Trata-se de projeto de pesquisa visando tese de doutorado, no qual os autores pretendem estudar polimorfismos genéticos de receptores para o sistema complemento e associação com a hanseníase.

Objetivo da Pesquisa:

Estudar polimorfismos de uma única base (SNPs) e haplótipos dos genes que codificam os receptores de complemento e verificar sua influência na hanseníase.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: baixo risco relacionado à coleta de sangue venoso periférico, que pode acarretar dor, hematoma e edema. Os pesquisadores informam que em caso de alguma complicação maior, cuidarão para que o paciente seja atendido por profissional de saúde ou, quando necessário, por uma equipe multiprofissional de saúde, sendo o atendimento gratuito.

Benefícios: a compreensão dos mecanismos poderá vir a contribuir para a terapêutica e prevenção dessa doença.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Continuação do Parecer: 279.970

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de solicitação de emenda a protocolo de pesquisa previamente aprovado (em 13/03/2013). Os pesquisadores anexam ofício solicitando emenda incluindo o serviço Centro de referência em Hanseníase e Tuberculose da PM de Sinop, MT e justificam a inclusão por ser o estado do Mato Grosso o que apresenta maior prevalência/incidência de hanseníase no Brasil.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os autores anexam como nova documentação solicitação de adendo ao protocolo incluindo novo serviço para a execução do estudo, o termo de anuência da prefeitura Municipal de SINOP, concordando com a realização.

Recomendações:

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Foi anexada a declaração final modelo CONEP, onde o Coparticipante declara ter lido e concordar com o Parecer deste CEP/SD.

- É obrigatório retirar na secretaria do CEP/SD uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com carimbo onde constará data de aprovação por este CEP/SD, sendo este modelo reproduzido para aplicar junto ao participante da pesquisa.

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa (Carta Circular nº. 003/2011 CONEP/CNS).

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 22 de Maio de 2013

**Assinador por: Claudia Seely Rocco
(Coordenador)**

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2ª andar

UF: PR

Município: CURITIBA

CEP: 80.060-240

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

ANEXO III – TCLE – PACIENTES

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO**PACIENTES**

Título do Projeto: “Influência da variabilidade gênica nos receptores de complemento na hanseníase”

Investigador: Sérgio Túlio Stinghen

Local da Pesquisa: Laboratório de Imunopatologia Molecular – Serviço de Anatomia Patológica – HC/UFPR

Endereço para contato com o pesquisador: Rua Padre Camargo, 280, Alto da Glória, Curitiba (Setor Ciências da Saúde), 2º andar, Laboratório de Imunopatologia Molecular.

Horário para contato: das 14 às 18 horas.

Telefones para contato com o pesquisador: Tel. (41)3360-1800 Ramal 6523; Celular: (41) 9681-7701 (Sérgio Túlio).

PROPÓSITO DA INFORMAÇÃO AO PACIENTE E DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa, coordenada por um profissional de saúde agora denominado pesquisador. Para poder participar, é necessário que você leia este documento com atenção. Ele pode conter palavras que você não entende. Por favor, peça aos responsáveis pelo estudo para explicar qualquer palavra ou procedimento que você não entenda claramente.

O propósito deste documento é dar a você as informações sobre a pesquisa e, se assinado, dará a sua permissão para participar no estudo. O documento descreve o objetivo, procedimentos, benefícios e eventuais riscos ou desconfortos caso queira participar. Você só deve participar do estudo se você quiser. Você pode se recusar a participar ou se retirar deste estudo a qualquer momento.

INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença milenar, de grande importância para a saúde pública, devido seu alto poder incapacitante. A doença causa lesão nos braços e pernas, o que provoca perda sensorial na pele e fraqueza muscular. A transmissão da hanseníase ocorre principalmente por uma bactéria eliminada pela boca e pelo nariz de indivíduos doentes não tratados. Entretanto, os mecanismos de defesa do organismo (sistema imunológico) conseguem destruir a bactéria que causa hanseníase e poucos indivíduos que entram em contato com pessoas doentes desenvolvem a doença. Os indivíduos que ficam doentes podem desenvolver uma forma mais leve da doença (hanseníase tuberculóide) ou mais grave (hanseníase virchowiana). Essas diferenças observadas podem estar relacionada com os mecanismos de defesa e o estudo destes mecanismos podem contribuir para o tratamento e prevenção da hanseníase.

PROPÓSITO DO ESTUDO

Pretendemos, através desse estudo, investigar mecanismos de defesa do organismo contra a hanseníase. Será utilizado o material biológico, adquirido por meio da coleta de sangue, para formar um “banco de material biológico” para este estudo e para futuros projetos de pesquisa. Entretanto, este material será apenas utilizado em outros projetos de pesquisa, caso estes sejam aprovados pelo Comitê de Ética e você será contactado(a) a cada nova pesquisa para autorizar ou negar sua participação. Este banco será mantido por 05 anos, sob a responsabilidade da Professora Iara Jose de Messias-Reason, sendo que, se necessário, serão solicitados mais 05 anos para o Comitê de Ética. Após este período, o material será descartado conforme as normas da Vigilância Sanitária.

SELEÇÃO

Nesta pesquisa incluímos pessoas que possuem hanseníase e indivíduos saudáveis, apenas adultos, maiores de 18 anos, de ambos os sexos e que assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido.

Não farão parte da pesquisa pessoas com idade abaixo de 18 anos e que não concordarem em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

PROCEDIMENTOS

Este estudo envolve duas etapas: aplicação de um questionário e coleta de sangue. Haverá risco mínimo de desconforto relacionado à coleta de sangue. Você poderá apresentar uma leve dor, ardência e a formação de manchas roxas. Em caso de desconforto na coleta do sangue nos responsabilizamos para que seja atendido por profissional de saúde no local da coleta, sendo o atendimento gratuito.

**Aprovado pelo Comitê de Ética
em Pesquisa do Setor de Ciências
da Saúde/UFPR.**

Em, 13 / 03 / 2013

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal _____

Pesquisador Responsável _____

Orientador _____

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA:

Sua decisão em participar deste estudo é voluntária. Você pode decidir não participar no estudo. Uma vez que você decidiu participar do estudo, você pode retirar seu consentimento e participação a qualquer momento. Se você decidir não continuar no estudo e retirar sua participação, você não perderá qualquer benefício ao qual você tem direito.

CUSTOS

Não haverá nenhum custo a você relacionado aos procedimentos previstos no estudo.

PAGAMENTO PELA PARTICIPAÇÃO

Sua participação é voluntária, portanto você não será pago por sua participação neste estudo.

PERMISSÃO PARA REVISÃO DE REGISTROS, CONFIDENCIALIDADE E ACESSO AOS REGISTROS:

O Investigador responsável pelo estudo e equipe irá coletar informações sobre você. Em todos esses registros um código substituirá seu nome. Todos os dados coletados serão mantidos de forma confidencial. Os dados coletados serão usados para a avaliação do estudo, membros das Autoridades de Saúde ou do Comitê de Ética podem revisar os dados fornecidos. Os dados também podem ser usados em publicações científicas sobre o assunto pesquisado. Porém, sua identidade não será revelada em qualquer circunstância.

Você tem direito de acesso aos seus dados. Você pode discutir esta questão mais adiante com a pessoa responsável pelo estudo.

CONTATO PARA PERGUNTAS

Se você ou seus parentes tiver (em) alguma dúvida com relação ao estudo, direitos do indivíduo, ou no caso de danos relacionados ao estudo, você deve contatar Sérgio Túlio Stinghen, pelo telefone (41) 3076-5546 (residencial) ou pelo celular (41) 9681-7701, ou pessoalmente no endereço Rua Padre Camargo, 280, Alto da Glória, Curitiba (Setor Ciências da Saúde), 2º andar, Laboratório de Imunopatologia Molecular, no horário das 14 às 18 horas.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE:

Eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que eu posso interromper minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito. Eu entendi a informação apresentada neste termo de consentimento. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas. Eu receberei uma cópia assinada e datada deste Documento de Consentimento Informado.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Local e data

(Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal)

(Assinatura do pesquisador)

Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR
Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br

Aprovado pelo Comitê de Ética
em Pesquisa do Setor de Ciências
da Saúde/UFPR.

Em, 13 / 03 / 2013

ANEXO IV – TCLE – GRUPO CONTROLE

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO

GRUPO CONTROLE

Título do Projeto: “Influência da variabilidade gênica nos receptores de complemento na hanseníase”

Investigador: Sérgio Túlio Stingen

Local da Pesquisa: Laboratório de Imunopatologia Molecular – Serviço de Anatomia Patológica – HC/UFPR

Endereço para contato com o pesquisador: Rua Padre Camargo, 280, Alto da Glória, Curitiba (Setor Ciências da Saúde), 2º andar, Laboratório de Imunopatologia Molecular.

Horário para contato: das 14 às 18 horas.

Telefones para contato com o pesquisador: Tel. (41)3360-1800 Ramal 6523; Celular: (41) 9681-7701 (Sérgio Túlio).

PROPÓSITO DA INFORMAÇÃO AO PACIENTE E DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa, coordenada por um profissional de saúde agora denominado pesquisador. Para poder participar, é necessário que você leia este documento com atenção. Ele pode conter palavras que você não entende. Por favor, peça aos responsáveis pelo estudo para explicar qualquer palavra ou procedimento que você não entenda claramente.

O propósito deste documento é dar a você as informações sobre a pesquisa e, se assinado, dará a sua permissão para participar no estudo. O documento descreve o objetivo, procedimentos, benefícios e eventuais riscos ou desconfortos caso queira participar. Você só deve participar do estudo se você quiser. Você pode se recusar a participar ou se retirar deste estudo a qualquer momento.

INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença milenar, de grande importância para a saúde pública, devido seu alto poder incapacitante. A doença causa lesão nos braços e pernas, o que provoca perda sensorial na pele e fraqueza muscular. A transmissão da hanseníase ocorre principalmente por uma bactéria eliminada pela boca e pelo nariz de indivíduos doentes não tratados. Entretanto, os mecanismos de defesa do organismo (sistema imunológico) conseguem destruir a bactéria que causa hanseníase e poucos indivíduos que entram em contato com pessoas doentes desenvolvem a doença. Os indivíduos que ficam doente podem desenvolver uma forma mais leve da doença (hanseníase tuberculóide) ou mais grave (hanseníase virchowiana). Essas diferenças observadas podem estar relacionada com os mecanismos de defesa e o estudo destes mecanismos podem contribuir para o tratamento e prevenção da hanseníase.

PROPÓSITO DO ESTUDO

Pretendemos, através desse estudo, investigar mecanismos de defesa do organismo contra a hanseníase. Será utilizado o material biológico, adquirido por meio da coleta de sangue, para formar um “banco de material biológico” para este estudo e para futuros projetos de pesquisa. Entretanto, este material será apenas utilizado em outros projetos de pesquisa, caso estes sejam aprovados pelo Comitê de Ética e você será contactado(a) a cada nova pesquisa para autorizar ou negar sua participação. Este banco será mantido por 05 anos, sob a responsabilidade da Professora Lara Jose de Messias-Reason, sendo que, se necessário, serão solicitados mais 05 anos para o Comitê de Ética. Após este período, o material será descartado conforme as normas da Vigilância Sanitária.

SELEÇÃO

Nesta pesquisa incluímos pessoas que possuem hanseníase e indivíduos saudáveis, apenas adultos, maiores de 18 anos, de ambos os sexos e que assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido.

Não farão parte da pesquisa pessoas com idade abaixo de 18 anos e que não concordarem em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

PROCEDIMENTOS

Este estudo envolve duas etapas: aplicação de um questionário e coleta de sangue. Haverá risco mínimo de desconforto relacionado à coleta de sangue. Você poderá apresentar uma leve dor, ardência e a formação de manchas roxas. Em caso de desconforto na coleta do sangue nos responsabilizamos para que seja atendido por profissional de saúde no local da coleta, sendo o atendimento gratuito.

Aprovado pelo Comitê de Ética
em Pesquisa do Setor de Ciências
da Saúde/UFPR.

Em, 13/03/2013

Rubricas:	
Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal	_____
Pesquisador Responsável	_____
Orientador	_____

1

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA:

Sua decisão em participar deste estudo é voluntária. Você pode decidir não participar no estudo. Uma vez que você decidiu participar do estudo, você pode retirar seu consentimento e participação a qualquer momento. Se você decidir não continuar no estudo e retirar sua participação, você não perderá qualquer benefício ao qual você tem direito.

CUSTOS

Não haverá nenhum custo a você relacionado aos procedimentos previstos no estudo.

PAGAMENTO PELA PARTICIPAÇÃO

Sua participação é voluntária, portanto você não será pago por sua participação neste estudo.

PERMISSÃO PARA REVISÃO DE REGISTROS, CONFIDENCIALIDADE E ACESSO AOS REGISTROS:

O Investigador responsável pelo estudo e equipe irá coletar informações sobre você. Em todos esses registros um código substituirá seu nome. Todos os dados coletados serão mantidos de forma confidencial. Os dados coletados serão usados para a avaliação do estudo, membros das Autoridades de Saúde ou do Comitê de Ética podem revisar os dados fornecidos. Os dados também podem ser usados em publicações científicas sobre o assunto pesquisado. Porém, sua identidade não será revelada em qualquer circunstância.

Você tem direito de acesso aos seus dados. Você pode discutir esta questão mais adiante com a pessoa responsável pelo estudo.

CONTATO PARA PERGUNTAS

Se você ou seus parentes tiver (em) alguma dúvida com relação ao estudo, direitos do indivíduo, ou no caso de danos relacionados ao estudo, você deve contatar Sérgio Túlio Stingen, pelo telefone (41) 3076-5546 (residencial) ou pelo celular (41) 9681-7701, ou pessoalmente no endereço Rua Padre Camargo, 280, Alto da Glória, Curitiba (Setor Ciências da Saúde), 2º andar, Laboratório de Imunopatologia Molecular, no horário das 14 às 18 horas.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE:

Eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que eu posso interromper minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito. Eu entendi a informação apresentada neste termo de consentimento. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas. Eu receberei uma cópia assinada e datada deste Documento de Consentimento Informado.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Local e data

(Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal)

(Assinatura do pesquisador)

Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR
Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br

Aprovado pelo Comitê de Ética
em Pesquisa do Setor de Ciências
da Saúde/UFPR.

Em, 13 / 03 / 2013